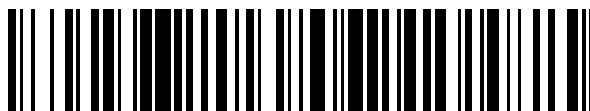


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 853**

51 Int. Cl.:

A61K 31/401 (2006.01)

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/4402 (2006.01)

A61K 31/4406 (2006.01)

A61K 31/4409 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/KR2013/004932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13183920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13800799 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2857007**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene un derivado de verbenona para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa**

30 Prioridad:

05.06.2012 KR 20120060314

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.06.2018

73 Titular/es:

**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS
FOUNDATION (100.0%)**

**Korea University Anam-dong 5(o)-ga 1 Seongbuk-gu
Seoul 136-701, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, WON KI y
CHOI, YONGSEOK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 673 853 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que contiene un derivado de verbenona para tratar o prevenir una enfermedad neurodegenerativa

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa, composición que contiene un derivado de verbenona o una sal del mismo, que tiene efectos sobre la inhibición de la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad, la inhibición del estrés oxidativo y la inhibición de la migración o infiltración de células inflamatorias intravasculares (por ejemplo, macrófagos y neutrófilos) a una zona del cerebro lesionada.

10 **Técnica anterior**

Las enfermedades cerebrales degenerativas son enfermedades relacionadas con la edad causadas por la disfunción de neuronas, y el interés social en las enfermedades cerebrales degenerativas ha crecido debido al rápido aumento de la población de edad avanzada. Las enfermedades cerebrales degenerativas se clasifican en función de los síntomas clínicos principales y las zonas cerebrales afectadas, e incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica.

- 15 Se sabe que las enfermedades cerebrales degenerativas son causadas por la muerte de neuronas que tienen gran importancia en la transmisión de información en el sistema nervioso cerebral, defectos en la formación o funciones de sinapsis que transmiten información entre neuronas y anomalías o disminuciones en la actividad eléctrica de neuronas, pero aún son difíciles de tratar radicalmente, y sus causas tampoco están claras.

- 20 Con el reciente desarrollo de la biología celular y molecular, se han investigado activamente las causas de las enfermedades cerebrales degenerativas y el desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades cerebrales degenerativas. Los estudios sobre el desarrollo de agentes terapéuticos contra enfermedades cerebrales degenerativas se han centrado principalmente en lo siguiente: (1) estimulación de la actividad colinérgica; (2) antagonismo contra receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato); (3) estudios de biología molecular y celular acerca del metabolismo de proteína β -amiloide o Tau y el desarrollo de vacunas y anticuerpos terapéuticos contra proteína generadora de β -amiloide como antígeno; (4) inducción de la expresión de factor neurotrófico; (5) desarrollo de antioxidantes capaces de inhibir el daño oxidativo inducido por proteína causal a células neuronales; y (6) desarrollo de fármacos antiinflamatorios capaces de inhibir respuestas inflamatorias originadas por la infiltración y actividad excesivas de células inflamatorias (Sonkusare *et al.*, Pharmacological Research, 51(1), 1-17, 2005; Stanaione *et al.*, Ann 1st Super Sanita, 47(1), 49-54, 2011; Halperin *et al.*, Neurotherapeutics, 6(1), 128-140, 2009).

Un inhibidor de AChE, que es un agente colinérgico, inhibe la degradación de ACh y restaura así la actividad de neurotransmisores colinérgicos. Como inhibidores de AChE, la tacrina, el donepezilo, la rivastigmina y la galantamina han sido aprobados por la FDA y se actualmente están disponibles comercialmente.

- 35 Se ha publicado que el estrés oxidativo es una causa importante de enfermedades cerebrales degenerativas del sistema nervioso central, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Jin DQ *et al.*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 331, 1264-1269, 2005; Lim CS *et al.*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 1212-1216, 2006).

- 40 El número de pacientes aquejados de enfermedades vasculares isquémicas (infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y trombosis) en el mundo fue de 25 millones en 2007, y se espera que continúe incrementándose hasta 28 millones en 2017 (DataMonitor, 2007). En la mayoría de los países de la OCDE, las enfermedades vasculares isquémicas han sido la primera causa de muerte (226,6 personas por cada 100.000 personas en el año 2004), seguidas por el cáncer (165,6 personas). El accidente cerebrovascular se divide en accidente cerebrovascular hemorrágico, caracterizado por lesión del tejido cerebral causada por la disrupción de vasos sanguíneos del cerebro, y accidente cerebrovascular isquémico, que es el infarto cerebral causado por el bloqueo del flujo de sangre al cerebro. El accidente cerebrovascular es una enfermedad con una incidencia muy elevada, y todos los años es la primera o la segunda causa de muerte en Corea, junto con el cáncer (datos de 2002 a 2008 de la Oficina Nacional de Estadística de Corea), y también Corea ocupa el segundo lugar entre los países de la OCDE en cuanto a la tasa de muertes causadas por un accidente cerebrovascular. Según el informe de 2008 de la Asociación Estadounidense del Corazón (AHA), anualmente se gastan 65.500 millones de dólares a causa de accidentes cerebrovasculares para tratar y cuidar enfermedades vasculares isquémicas, pero el tamaño del mercado de agentes terapéuticos para el accidente cerebrovascular asciende a solo 1.300 millones de dólares. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos activos con el fin de desarrollar agentes terapéuticos para el accidente cerebrovascular isquémico, que tendrá un tamaño potencial de mercado de 22.000 millones de dólares o más si se lanzan al mercado en pocos años agentes terapéuticos con eficacia probada.

- 55 En Corea, el accidente cerebrovascular es la primera causa de muerte y ocupa un lugar más alto que en otros países altamente desarrollados, incluidos EUA, Canadá, Australia y similares. El accidente cerebrovascular destruye la calidad de vida al causar daños en las funciones motoras y sensoriales, y alteraciones en funciones de orden

superior tales como memoria, aprendizaje, operación y deducción, y causa muchos dolores mentales y físicos al paciente y a sus familiares hasta el fallecimiento del paciente. En los últimos años, al haber aumentado rápidamente población de edad avanzada, la incidencia del accidente cerebrovascular y el aumento en el tiempo de supervivencia después del inicio del accidente cerebrovascular se ha convertido en un importante problema social. Por lo tanto, se requiere desarrollar fármacos terapéuticos para aliviar los síntomas y tratar el accidente cerebrovascular.

A pesar de la importancia clínica del accidente cerebrovascular y el gran tamaño del mercado, como se ha mencionado más arriba, el desarrollo de agentes terapéuticos para el accidente cerebrovascular es aún insignificante, y los agentes terapéuticos clínicamente aprobados para el accidente cerebrovascular incluyen únicamente el activador tisular de plasminógeno (t-PA). El accidente cerebrovascular tiene diversas causas, y comprende distintas enfermedades con diferentes factores etiológicos, entre ellos el infarto cerebral, la hemorragia cerebral y hemorragia subaracnoidea, y similares. Además, el accidente cerebrovascular puede ser causado por diversas enfermedades cerebrovasculares, entre ellas la arterioesclerosis, la angiopatía amiloide cerebral y la disección aórtica, y también puede ser causado por una embolia cardiogénica debida a arritmia o enfermedad arterial coronaria. Las causas del accidente cerebrovascular son diversas, como se ha descrito en lo que antecede, pero en términos de biología celular se considera que el mecanismo común consiste en una disminución del suministro de sangre y la muerte celular resultante. Por esta razón, la comprensión del mecanismo de la muerte celular neuronal isquémica es una tecnología central para desarrollar las estrategias terapéuticas para la prevención, el control y el tratamiento del accidente cerebrovascular.

En Corea y otros países, numerosos grupos de investigación se han esforzado en prevenir las enfermedades cerebrales mediante el estudio del mecanismo de la muerte neuronal, como se ha mencionado más arriba. En el caso del accidente cerebrovascular, aún no se ha desarrollado un agente terapéutico distintivo, y muchos médicos clínicos son reacios a utilizar incluso t-PA, el único agente terapéutico que se emplea clínicamente para disolver los trombos producidos en los vasos sanguíneos cerebrales, debido a sus efectos secundarios tales como hemorragia cerebral. Hasta ahora, muchos grupos de investigación han intentado desarrollar un agente terapéutico contra el accidente cerebrovascular basado, o bien en un antagonista contra receptor de ácido glutámico, que es un neurotransmisor excitatorio, o bien en un antioxidante, pero tales intentos han fallado debido a la eficacia insignificante de los fármacos o a su toxicidad.

El tiempo necesario para que un paciente con accidente cerebrovascular llegue a la sala de urgencias de un hospital tras el inicio del accidente cerebrovascular suele ser de varias horas o más. En el transcurso de algunos minutos o algunas horas después del inicio del accidente cerebrovascular, las células neuronales resultan dañadas principalmente por la neurotoxicidad excitatoria causada por la liberación excesiva de ácido glutámico, y secundariamente son dañadas por la exposición a excesivos radicales de oxígeno y de nitrógeno que se generan con el paso del tiempo. Al cabo de algunas decenas de horas, las células neuronales quedan dañadas de manera continua y grave por respuestas inflamatorias, y en este caso, no tiene sentido clínicamente emplear un inhibidor de la neurotoxicidad excitatoria.

Como se ha mencionado más arriba, el accidente cerebrovascular no es una enfermedad causada por un único factor, sino que es una enfermedad que provoca lesiones cerebrales a través de diversas rutas y mecanismos de muerte celular. En los últimos años se ha intentado conseguir un efecto terapéutico sinérgico frente al accidente cerebrovascular mediante el uso de fármacos con distintos mecanismos en combinación. Por ejemplo, la administración de aspirina en combinación con dipiridamol ha mostrado un pronóstico favorable para el accidente cerebrovascular en comparación con la administración de aspirina sola (Chatuvedi S., Clin Therap, 30(7), 1196-205, 2008). Además, una combinación de 17 β -estradiol y t-PA ha extendido la ventana de tiempo terapéutica en pacientes con accidente cerebrovascular isquémico, ya que el 17 β -estradiol redujo la hemorragia cerebral originada por la expresión acrecentada de urocinasa, MMP2 y MMP9 provocada por t-PA (Liu R. *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 332(3), 1006-12, 2010). La administración de memantina (que es un antagonista de receptor de NMDA) en combinación con clenbuterol (que es agonista de receptor beta 2 de beta-adrenalina) ha mostrado un efecto sinérgico sobre la inhibición de la lesión cerebral isquémica en un modelo isquémico focal permanente. Además, la administración de memantina en combinación con el bloqueador de iones calcio topiramato ha mostrado un efecto sinérgico sobre la inhibición de la lesión cerebral inducida por hipoxia en ratas neonatas (Culmsee C. *et al.*, Stroke, 35(5), 1197-202, 2004). Sin embargo, estos estudios están destinados principalmente a aliviar los síntomas, y no han mostrado efectos sinérgicos basados en mecanismos protectores del tejido cerebral.

Para comprender la lesión isquémica del tejido cerebral provocada por la isquemia y desarrollar un fármaco para inhibir esta lesión del tejido cerebral, deben entenderse el mecanismo y la ruta de la lesión del tejido cerebral posterior a la isquemia. En general, la lesión o muerte de las células cerebrales posterior a la isquemia está causada por diversos factores. Por ejemplo, se sabe que la excitotoxicidad, la despolarización periinfarto, el estrés oxidativo y la inflamación están asociados con el desarrollo de lesión cerebral isquémica (Dimagl *et al.*, Trends Neurosci., 22, 391-397, 1999). Por lo tanto, es crucial entender los muy diversos perfiles temporales (por ejemplo, inicio y duración) e interrumpir adecuadamente sus cascadas patológicas.

La muerte neuronal por excitotoxicidad puede ser inhibida por un antagonista de receptor de glutamato, y son receptores iónicos sobre los que actúa el glutamato los receptores de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), kainato y NMDA (N-metil-D-aspartato). En particular, se han realizado numerosos estudios

sobre la muerte celular debida a la actividad del receptor de NMDA (Standridge J.B., Clin. Ther., 26(5), 615-630, 2004). Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, los bloqueadores de receptor de NMDA no han tenido éxito en ensayos clínicos, porque presentaban efectos insignificantes o eran tóxicos. El bloqueante de receptor de NMDA MK-801 redujo significativamente la lesión cerebral isquémica, pero tenía el gran inconveniente de una breve ventana de tiempo terapéutica. El MK-801 mostró un efecto de protección neuronal en ratas y jerbos solo cuando se administró dentro de 1 hora después del inicio de isquemia focal (Margaill *et al.*, J Cereb Blood Flow Metab, 16, 107-113, 1996; Hatfield RH *et al.*, Eur J Pharmacol, 216, 1-7, 1992). Además, el MK-801 retrasa la muerte neuronal posisquémica, pero no mejora la recuperación neurológica ni la supervivencia de punto final tras varias semanas de tratamiento (Valtysson J. *et al.*, Acta Neurochir (Wien), 129, 58-63, 1994; Von Lubitz DK *et al.*, Eur J Pharmacol, 233, 95-100, 1993). Los receptores del neurotransmisor excitatorio ácido glutámico incluyen el receptor de AMPA junto con el receptor de NMDA. Los antagonistas para los receptores de AMPA no mostraron efectos protectores significativos contra el déficit neurológico a los 28 días post-MCAO (Colbourne F *et al.*, Stroke, 30, 662-668, 1999). La corta ventana terapéutica y la falta de efecto terapéutico a largo plazo de los antagonistas de receptor de NMDA o de AMPA sugieren que dichos receptores solo desempeñan un papel transitorio en la cascada isquémica temprana. Por lo tanto, se cree que otros procesos fisiopatológicos que no se ven afectados por estos tratamientos contribuyen al daño isquémico cerebral diferido.

Al igual que diversas enfermedades degenerativas, el estrés oxidativo tiene un efecto muy importante sobre la muerte o la pérdida de la función de células en el accidente cerebrovascular. Por ello, se han emprendido activamente estudios sobre los efectos terapéuticos de antioxidantes en el accidente cerebrovascular isquémico (Salama M. *et al.*, Co-Enzyme Q10 to Treat Neurological Disorders: Basic Mechanisms, Clinical Outcomes, and Future Research Direction. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013; Rodrigo R. *et al.*, Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013). En Japón, la edaravona, que tiene como principal mecanismo un efecto antioxidante, se comercializa como agente terapéutico para el accidente cerebrovascular (Firuzi O *et al.*, Curr Med Chem., 18(25), 3871-88, 2011; Yoshida H. *et al.*, CNS Drug Rev., 12(1), 9-20, 2006).

Varias horas después de la neurotoxicidad excitatoria posisquemia, se inicia una respuesta inflamatoria en la zona lesionada del cerebro, y continúa durante un período que va desde varios días a varias semanas, para empeorar la lesión cerebral. Por ello, en los últimos años se ha intentado tratar el accidente cerebrovascular isquémico utilizando agentes antiinflamatorios (Price CJ *et al.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 74, 1476-1484, 2003; Salama M, Co-Enzyme Q10 to Treat Neurological Disorders: Basic Mechanisms, Clinical Outcomes, and Future Research Direction. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013; Rodrigo R. *et al.*, Oxidative Stress and Pathophysiology of Ischemic Stroke: Novel Therapeutic Opportunities. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2013). Además, recientemente se ha publicado que células inflamatorias infiltradas desde vasos sanguíneos desempeñan un papel principal en la agravación de la lesión cerebral en el accidente cerebrovascular isquémico (Kang GH *et al.*, J Neurol Sci., 15, 318(1-2), 25-30, 2012; Choi IY *et al.*, Am J Pathol, 179(4), 2042-52, 2012; Choi YK *et al.*, Free Radic Res., 44(8), 925-35, 2010; Choi IY *et al.*, Free Radic Res., 44(5), 541-51, 2010; Lee JC *et al.*, Glia, 50(2), 168-81, 2005). Por añadidura, se ha publicado que respuestas antiinflamatorias mediadas por receptor B2 de cannabinoide inhiben el daño al tejido cerebral isquémico (Choi IY *et al.*, Am J Pathol, 182(3), 928-39, 2013).

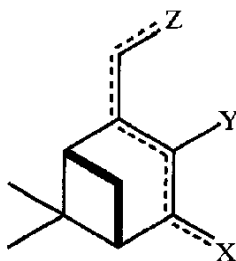
Así pues, se considera que el desarrollo de fármacos que posean diversas actividades de protección celular es esencial para el tratamiento completo del accidente cerebrovascular. Para lograr este propósito, es decir, desarrollar un fármaco terapéutico pleiotrópico que presente diversos mecanismos de protección celular, los autores de la presente invención han desarrollado un derivado de (1S)-(-)-verbenona. La (1S)-(-)-verbenona es una feromona antiagregación natural generada por escarabajos de corteza a partir de un precursor de la resina del árbol hospedante, el alfa-pineno. Se ha informado que aceites esenciales que contienen (1S)-(-)-verbenona presentan actividades biológicas tales como actividad antimicrobiana o actividad insecticida (Bernarde WA, Z Naturforsch C, 65, 588-93, 2010; Martinez-Velazquez M., J Med Entomol, 48, 822-827, 2011). Además, el documento WO 2000/63159 describe que la verbenona [(1S,5S)-4,6,6-trimetilbicyclo[3.3.3]hept-3-en-2-ona) y sus derivados poseen efectos antiinflamatorios en las vías respiratorias.

Sin embargo, el documento de patente antes mencionado no describe ni sugiere los efectos de derivados de verbenona sobre la reducción de la muerte neuronal y el estrés oxidativo, la inhibición de la lesión cerebral isquémica y la inhibición de la migración de células inflamatorias.

Ju Chung *et al.* (Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 431, n.º 3, páginas 484-489) describen que la regulación positiva de la hemooxigenasa-1 astroglial por un derivado sintético de (S)-verbenona, LMT-335, mejora la lesión evocada por oxígeno y privación de glucosa en neuronas corticales.

El documento US 6,649,658 describe derivados sólidos y estables de (-)-verbenona que tienen la fórmula siguiente, en donde, cuando X = O, Z = H, = CHAr, = C(OH)COOEt, = NOR; Y = H, NH₂, NH₃⁺X₁⁻, NHCOAr, NHCOR, NHCONHR, NHCONHAr, X₁⁻ = anión farmacéuticamente aceptable; Ar = arilo o heteroarilo, preferiblemente fenilo, 4-clorofenilo, 2-furilo, 2-tienilo, 2-hidroxifenilo, 2-acetoxifenilo; R = H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₄-C₆, CH₂COOH, CH₂COOEt, CH₂COCH₃, CH₂CN, CH₂COCH₂COOEt, CH₂C₆H₅; y, cuando X = dimetilamino, dietilamino, pirrolidino, piperidino o morfolino: Y = H; Z = H, CONHAr, COHNR; Ar = arilo, preferiblemente fenilo; R = H, alquilo C₁-C₄, cicloalquilo C₄-C₆. El documento también describe los procedimientos para preparar estos derivados y los

intermedios utilizados en esos procedimientos. Los derivados se caracterizan por su solubilidad en agua; algunos de ellos poseen también una elevada actividad antiinflamatoria.



El documento US 6,214,888 describe dioles monoterpénicos monocíclicos y bicíclicos que estimulan la melanogénesis en la piel, el cabello, la lana o el pelo de mamíferos, y se indica que son útiles para tratar o prevenir diversos trastornos cutáneos y proliferativos, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades reguladas por la ruta de óxido nítrico/GMP cíclico/proteína cinasa G.

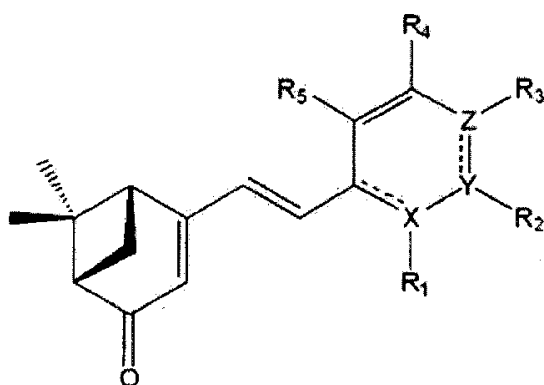
En consecuencia, los autores de la presente invención han medido la excitotoxicidad inducida por NMDA y la muerte celular en un modelo de rata hipóxico-isquémica para examinar los efectos de derivados de verbenona sobre la reducción de la muerte neuronal y el estrés oxidativo y la inhibición de lesión cerebral isquémica y respuestas inflamatorias, y han realizado un experimento sobre las actividades antioxidantes de derivados de verbenona. Como resultado, los autores de la presente invención han descubierto en primer lugar que derivados de verbenona tienen un efecto sobre el tratamiento de enfermedades cerebrales degenerativas. Más específicamente, los autores de la presente invención han encontrado que derivados de verbenona conformes a la presente invención reducen la muerte neuronal y el estrés oxidativo, y presentan excelentes efectos sobre la inhibición de lesión cerebral isquémica y de respuestas inflamatorias *in vivo*, completando así la presente invención.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar el nuevo uso de un derivado de verbenona para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa.

Para lograr el antedicho objetivo, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

Fórmula 1



en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C_1-C_3 , un grupo alcoxi C_1-C_3 , un grupo amino, un grupo alquilamina C_1-C_3 , un grupo alquildiamina C_1-C_3 , un anillo aromático C_5-C_8 , un anillo cíclico C_5-C_8 y un anillo heteroaromático C_5-C_8 ; X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, un átomo de carbono o al menos un heteroátomo seleccionado del grupo consistente en átomos de N, O y S; y

----- indica un enlace doble o un enlace sencillo.

En la presente invención, el derivado de verbenona mencionado puede funcionar para reducir la muerte neuronal y el estrés oxidativo, inhibir la lesión cerebral isquémica e inhibir la migración de células inflamatorias.

En la presente invención, la enfermedad cerebral degenerativa puede ser accidente cerebrovascular, parálisis,

demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington. Específicamente, puede ser accidente cerebrovascular, demencia vascular o demencia de tipo Alzheimer. Más específicamente, puede ser accidente cerebrovascular, y aún más específicamente, enfermedad de accidente cerebrovascular isquémico.

- 5 En la presente invención, la composición puede contener además un vehículo, excipiente o diluyente adecuado que se usa generalmente en la preparación de composiciones farmacéuticas.

- 10 En la presente invención, la composición se puede formular o usar en combinación con uno o más fármacos seleccionados del grupo consistente en bloqueantes de canal de calcio, antioxidantes, antagonistas de glutamato, anticoagulantes, fármacos antihipertensivos, fármacos antitrombóticos, antihistamínicos, fármacos antiinflamatorios, fármacos anticancerosos y antibióticos.

La presente invención también proporciona un alimento funcional para uso en un método para prevenir o aliviar una enfermedad cerebral degenerativa, comprendiendo el alimento, como ingrediente activo, un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La Figura 1 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención en la protección de células neuronales corticales de rata.

La Figura 2 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención contra la excitotoxicidad inducida por NMDA.

- 20 La Figura 3 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención en la inhibición del estrés oxidativo intracelular.

La Figura 4 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención sobre la reducción de la lesión isquémica, edema cerebral y déficits neurológicos en un modelo de isquemia cerebral focal *in vivo*.

La Figura 5 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención sobre un aumento de la actividad antioxidante en el tejido cerebral con lesión isquémica en un modelo de isquemia cerebral focal *in vivo*.

- 25 La Figura 6 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención en la inhibición de la migración e infiltración de células inflamatorias en el tejido cerebral con lesión isquémica en un modelo de isquemia cerebral focal *in vivo*.

La Figura 7 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención en la inhibición de la expresión de citocinas en tejido cerebral con lesión isquémica en un modelo de isquemia cerebral focal *in vivo*.

- 30 La Figura 8 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención en la inhibición de un aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica alrededor de tejido cerebral con lesión isquémica en un modelo de isquemia cerebral focal *in vivo*.

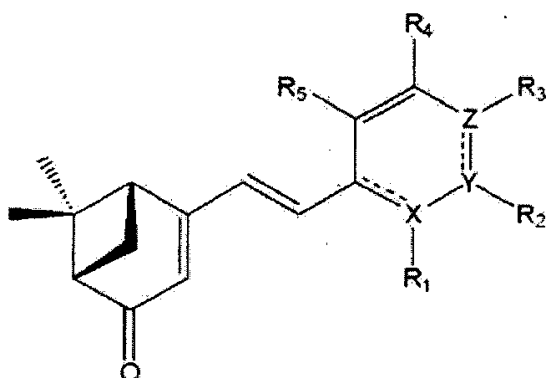
- 35 La Figura 9 muestra los efectos de compuestos derivados de la presente invención sobre los aumentos en la tasa de supervivencia a largo plazo y la recuperación neurológica de ratas con lesión isquémica en modelos de isquemia cerebral focal *in vivo*.

La Figura 10 muestra que compuestos derivados de la presente invención no presentan un aumento significativo en el área del hematoma autólogo inducido por sangre en un modelo de accidente cerebrovascular hemorrágico *in vivo*.

Mejor modo para realizar la invención

El derivado de verbenona antes mencionado tiene la estructura según la Fórmula 1:

- 40 Fórmula 1



en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado de un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C_1-C_3 , un grupo alcoxi C_1-C_3 , un grupo amino, un grupo alquilamina C_1-C_3 , un grupo alquildiamina C_1-C_3 , un anillo aromático C_5-C_8 , un anillo cíclico C_5-C_8 y un anillo heteroaromático C_5-C_8 ; X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, un átomo de carbono o al menos un heteroátomo seleccionado del grupo consistente en átomos de N, O y S; y

----- indica un enlace doble o un enlace sencillo.

Entre los compuestos que pertenecen a la definición de la Fórmula 1, se prefieren compuestos en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo amino, un anillo aromático C_5-C_6 , un anillo cíclico C_5-C_6 y un anillo heteroaromático C_5-C_6 , y más preferiblemente al menos uno seleccionado de un hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de entre F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo metoxi, un grupo fenilo, un grupo pirrol y un grupo piridina; y X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, un átomo de carbono o al menos un heteroátomo seleccionado del grupo consistente en átomos de N, O y S, y más preferiblemente al menos un átomo seleccionado del grupo consistente en un átomo de carbono y un átomo de N.

El compuesto más preferible del grupo de compuestos que pertenecen a la definición de la Fórmula 1 se selecciona de los siguientes compuestos:

- (1S,5R)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3a);
- (1S,5R)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3b);
- (1S,5R)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3c);
- (1S,5R)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3d);
- (1S,5R)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3e);
- (1S,5R)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3f);
- (1S,5R)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3g);
- (1S,5R)-4-(2-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3h);
- (1S,5R)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3i);
- (1S,5R)-6,6-dimetil-4-estirilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4a);
- (1S,5R)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4b);
- (1S,5R)-4-(4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4c);
- (1S,5R)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4d);
- (1S,5R)-4-(4-(1H-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4e);
- (1S,5R)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4f);
- (1S,5R)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4g);
- (1S,5R)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4h);

(1*S*,5*R*)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4i);

(1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-2-il)vinil)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5a);

(1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-3-il)vinil)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5b); y

(1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-4-il)-vinil)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5c).

- 5 Los compuestos de la invención representados por la Fórmula 1 se pueden preparar como sales o solvatos farmacéuticamente aceptables según métodos convencionales conocidos en la técnica.

Una sal farmacéuticamente aceptable es, preferiblemente, una sal por adición de ácido formada con un ácido libre farmacéuticamente aceptable. Se puede preparar una sal de adición de ácido utilizando un método convencional, por ejemplo disolviendo un compuesto en una cantidad en exceso de disolución acuosa de ácido para formar una sal y precipitando la sal formada mediante el uso de un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo metanol, etanol, acetona o acetonitrilo. Como alternativa, se puede formar una sal por adición de ácido calentando una cantidad equimolar de un compuesto y un ácido en agua o alcohol (por ejemplo, monometil éter de glicol), y secando luego la mezcla por evaporación o filtrando por succión la sal precipitada.

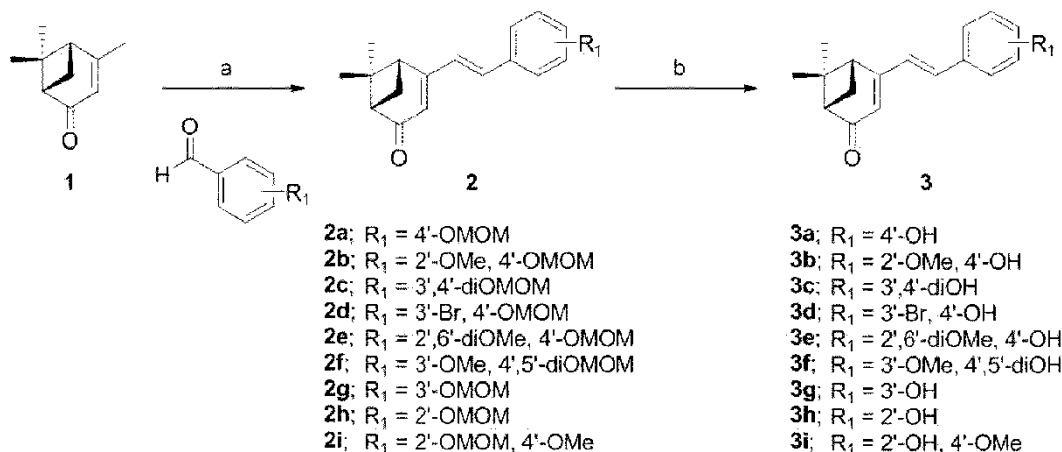
En este caso, el ácido libre puede ser un ácido inorgánico o un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido estánnico, y los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido metansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido tartárico, ácido fumárico, ácido mandélico, ácido propiónico, ácido láctico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido galacturónico, ácido glutámico, ácido glutárico, ácido glucurónico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido vanílico y ácido yodhídrico.

Además, se puede preparar una sal metálica farmacéuticamente aceptable utilizando una base. Se puede obtener una sal de metal alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo, disolviendo un compuesto en una cantidad en exceso de solución de hidróxido de metal alcalino o de hidróxido de metal alcalinotérreo, filtrando la sal no disuelta, y luego secando por evaporación el filtrado. Como sales metálicas, son farmacéuticamente adecuadas las sales de sodio, de potasio o de calcio. Además, se pueden obtener las sales de plata correspondientes haciendo reaccionar una sal de metal alcalino o alcalinotérreo con una sal de plata adecuada (por ejemplo, nitrato de plata).

Salvo que se indique otra cosa en la presente memoria, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que tienen una estructura según la Fórmula 1 incluyen sales de grupos ácidos o básicos, que pueden estar presentes en los compuestos de la Fórmula 1. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de sodio, de calcio y de potasio de un grupo hidroxilo, y otras sales farmacéuticamente aceptables de un grupo amino, entre ellas hidrobromuro, sulfato, hidrogenosulfato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, acetato, succinato, citrato, tartrato, lactato, mandelato, metansulfonato (mesilato) y para-toluensulfonato (tosilato). Las sales se pueden preparar utilizando un método de preparación de sal conocido en la técnica.

Se pueden preparar los compuestos de la Fórmula 1 por métodos de síntesis conocidos en la técnica, y se pueden sintetizar químicamente mediante los métodos que se muestran en los esquemas de reacción siguientes, pero sin estar limitados a los mismos.

Esquema de reacción 1

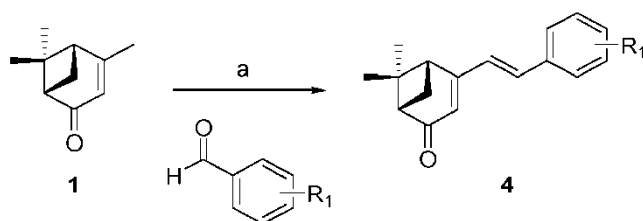


^aReacción y condiciones: a) KOH, MeOH, 60 °C, 6 h; b) HCl al 10%, MeOH, t. a., 24 h.

Se puede condensar (1*S*)-(-)-verbenona (1) disponible comercialmente, en presencia de una base, con derivados (2a-i) de benzaldehído que tienen un grupo hidroxiestirilo, y luego desproteger con ácido, preparando así diversos

derivados (**3a-i**) de verbenona con un sustituyente alcoxi o bromo o un grupo funcional fenólico.

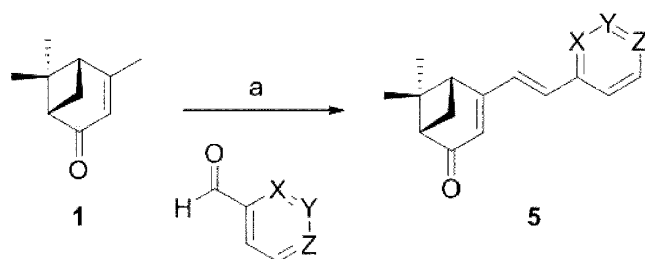
Esquema de reacción 2



4a; R₁ = H
4b; R₁ = 4'-F
4c; R₁ = 4'-OMe
4d; R₁ = 4'-Ph
4e; R₁ = 4'-pirrol
4f; R₁ = 3',4'-di-OMe
4g; R₁ = 3',5'-di-OMe
4h; R₁ = 2',5'-di-OMe
4i; R₁ = 2'-OMe, 5'Br

^aReacción y condiciones: a) KOH, MeOH, 60 °C, 6 h.

5 Esquema de reacción 3



5a; X = N, Y = C, Z = C
5b; X = C, Y = N, Z = C
5c; X = C, Y = C, Z = N

^aReacción y condiciones: a) NaOMe, MeOH, 60 °C, 6 h.

En otro método para sintetizar derivados, se puede someter (1S)-(-)-verbenona (**1**) disponible comercialmente a un proceso similar al proceso del Esquema de reacción 1 para introducir un grupo estirilo en derivados que tienen diversos grupos funcionales, preparando así diversos derivados (**4a-i**, **5a-c**) de verbenona que tienen un anillo aromático.

En la presente invención, se han analizado los nuevos efectos de derivados de verbenona en el tratamiento de la enfermedad cerebral degenerativa. Como resultado, se ha encontrado que derivados de verbenona inhibían la excitotoxicidad inducida por NMDA y el estrés oxidativo intracelular, aumentaban la actividad antioxidante, inhibían la migración e infiltración de células inflamatorias e inhibían la expresión de citocinas. Los resultados del análisis se describen con detalle en los ejemplos que siguen.

La presente invención se dirige a una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa, comprendiendo la composición, como ingrediente activo, un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa (no reivindicado) comprende administrar a un sujeto un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En este caso, la administración puede realizarse *in vivo* o *in vitro*.

En la presente invención, la enfermedad cerebral degenerativa puede seleccionarse del grupo consistente en accidente cerebrovascular, parálisis, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica. En la presente memoria, la expresión "enfermedad cerebral degenerativa" significa cualquier enfermedad causada por la muerte de neuronas que tienen gran importancia en la transmisión de información en el sistema nervioso cerebral, defectos en la formación o funciones de sinapsis que transmiten información entre neuronas, o anomalías o disminuciones en la actividad eléctrica de neuronas.

En la presente invención, la enfermedad cerebral degenerativa es preferiblemente accidente cerebrovascular y, más preferiblemente, enfermedad de accidente cerebrovascular isquémico.

La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar por diversas vías, entre ellas, pero sin limitación, la vía oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intradural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, gastrointestinal, local, sublingual y rectal. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral o parenteral. En la presente memoria, el término "parenteral" incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal. La composición farmacéutica de la presente invención también se puede administrar en forma de supositorios para administración por vía rectal.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral en cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, entre ellas, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos que se utilizan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Para la administración por vía oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones acuosas, se combina el ingrediente activo con agentes emulsionantes y suspensionantes. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes y/o colorantes.

El nivel de dosis de la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de diversos factores, entre ellos la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el momento de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos y la gravedad de la enfermedad específica que debe prevenirse o tratarse. La composición farmacéutica según la presente invención se puede formular en forma de píldoras, comprimidos revestidos de azúcar, cápsulas, líquido, gel, jarabe, lechada o suspensiones.

En la presente invención, la composición farmacéutica se puede formular o usar en combinación con uno o más agentes seleccionados del grupo consistente en bloqueantes de canal de calcio, antioxidantes, antagonistas de glutamato, anticoagulantes, antihipertensivos, agentes antitrombóticos, agentes antihistamínicos, agentes antiinflamatorios, agentes anticancerosos y antibióticos.

La composición farmacéutica se puede usar ventajosamente porque utiliza un derivado de verbenona derivado de una sustancia natural que tiene una actividad excelente para inhibir la muerte neuronal y el estrés oxidativo y provoca menos toxicidad y efectos secundarios.

En otro aspecto más, la presente invención se dirige a un alimento funcional o a un aditivo alimentario para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa y que comprende, como ingrediente activo, un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El alimento funcional que incluye el compuesto de la presente invención se puede emplear en diversas aplicaciones, entre ellas medicamentos, alimentos o bebidas para la prevención de la inflamación. Los ejemplos del alimento funcional de la presente invención incluyen diversos alimentos, golosinas, chocolates, bebidas, gomas, té, complejos vitamínicos, alimentos complementarios para la salud, y similares, y se pueden emplear en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas o bebidas.

Un derivado de verbenona que está contenido como componente activo en el alimento funcional de la presente invención tiene excelentes efectos sobre la protección de células neuronales, la inhibición del estrés oxidativo y la inhibición de la expresión de citocinas, como se desprende claramente de los resultados del análisis de los mecanismos biológicos que se describe más adelante. Por lo tanto, será obvio para los expertos en la materia que el uso del derivado de verbenona en alimentos manifiesta excelentes efectos.

La composición farmacéutica que comprende el compuesto según la presente invención se puede formular según un método convencional. Por ejemplo, se puede formular en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, suspensiones, emulsiones, jarabes, aerosoles y similares para aplicaciones por vía oral, agentes para aplicaciones por vía externa, supositorios y soluciones de inyección estériles. Los vehículos, excipientes y diluyentes que pueden estar contenidos en la composición según la presente invención incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, estearato de magnesio y aceite mineral. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto según la presente invención se formula utilizando diluyentes o excipientes, tales como cargas, extendedores, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes o tensioactivos, que se utilizan habitualmente. Las formulaciones sólidas para administración por vía oral incluyen comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, etc. Dichas formulaciones sólidas se preparan mezclando el compuesto de la presente invención con al menos un excipiente, tal como algodón, almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, gelatina, etc. Además de excipientes simples, también se pueden añadir lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, etc. Las formulaciones líquidas para

administración por vía oral, tales como suspensiones, soluciones orales, emulsiones, jarabes, etc., pueden incluir diluyentes simples, por ejemplo, agua y parafina líquida, así como diversos excipientes, por ejemplo agentes humectantes, edulcorantes, sustancias aromáticas, conservantes, etc. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas esterilizadas, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, agentes liofilizados, supositorios, etc. Se pueden preparar disolventes y suspensiones no acuosas utilizando propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, o ésteres inyectables tales como oleato de etilo. Como base para supositorios se pueden emplear Witepsol, Macrogol, Tween 61, grasa de cacao, grasa de laurina, glicerogelatina, etc.

La posología preferida del compuesto de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de diversos factores, entre ellos el estado y el peso del paciente, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco, la vía y momento de administración, y la puede determinar adecuadamente un experto en la materia. No obstante, para lograr los efectos deseados se puede administrar el compuesto de la presente invención en una dosis diaria de 0,01 mg/kg a 10 g/kg, preferiblemente de 1 mg/kg a 1 g/kg. Se puede administrar el compuesto en una sola dosis al día o en múltiples dosis al día. La posología no pretende limitar en modo alguno la presente invención.

Además, la presente invención se dirige a un alimento funcional para la salud, para uso en un método para prevenir o mejorar una enfermedad cerebral degenerativa, comprendiendo el alimento, como ingrediente activo, un derivado de verbenona que tiene una estructura según la Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El alimento funcional para la salud que incluye el compuesto de la presente invención puede usarse en diversas aplicaciones, entre ellas fármacos, alimentos y bebidas, para la prevención y mejoría de enfermedades cerebrales degenerativas. Los ejemplos del alimento funcional de la presente invención incluyen diversos alimentos, bebidas, gomas, té, complejos vitamínicos, alimentos complementarios para la salud y similares, y se pueden usar en forma de polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas o bebidas.

Los ejemplos de alimentos a los que se puede añadir el compuesto de la presente invención incluyen diversas golosinas, bebidas, gomas, té, complejos vitamínicos o alimentos complementarios para la salud, y similares.

Se puede añadir el compuesto de la presente invención a alimentos o bebidas para prevenir y mejorar enfermedades cerebrales degenerativas. Con respecto al contenido del compuesto en alimentos o bebidas, generalmente se puede añadir el compuesto de la presente invención en una cantidad de 0,01-15% en peso basado en el peso total del alimento funcional para la salud de la presente invención, y el compuesto de la presente invención se puede añadir en una cantidad de 0,02-10 g, y preferiblemente 0,3-1 g, basado en 100 ml de la composición de bebida para la salud de la presente invención.

Siempre que la composición de bebida para la salud de la presente invención comprenda el compuesto como ingrediente esencial, no existe ninguna limitación particular en otros componentes líquidos de la composición de bebida, y la composición puede comprender además uno o más aditivos, tales como diversos sabores o carbohidratos naturales que se usan comúnmente en bebidas. Los ejemplos de carbohidratos naturales para tales fines incluyen azúcares comunes tales como monosacáridos, por ejemplo glucosa, fructosa y similares; disacáridos, por ejemplo maltosa, sacarosa y similares; y polisacáridos, por ejemplo dextrina, ciclodextrina y similares, y azúcar-alcoholes tales como xilitol, sorbitol, eritritol y similares. Además de lo anterior, como sabores se pueden emplear ventajosamente sabores naturales (taumatina, compuesto de stevia (por ejemplo, rebaudiósido A, glicirizina y similares) y sabores sintéticos (sacarina, aspartamo y similares). El contenido de carbohidrato natural en la composición de la presente invención asciende aproximadamente a 1-20 g, y con preferencia aproximadamente 5-12 g, basado en 100 ml de la composición.

Además, la composición de la presente invención puede contener además diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), condimentos (condimentos artificiales y condimentos naturales), agentes colorantes y agentes mejoradores (queso, chocolate y similares), ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, controladores de pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcoholes, agentes carbonatadores utilizados en bebidas carbonatadas, y similares. Además, la composición de la presente invención puede contener además pulpa de fruta para la preparación de bebidas de zumo de fruta natural, bebidas de zumo de fruta y bebidas vegetales. Estos aditivos se pueden emplear de forma independiente o en combinación. Aunque el contenido de estos aditivos en la composición de la presente invención no tiene particular importancia en la presente invención, generalmente se selecciona dentro del intervalo de 0-20 partes en peso sobre la base de 100 partes en peso de la composición de la presente invención.

La composición de la presente invención comprende el compuesto en una cantidad de 0,01 a 99% en peso, basado en el peso total de la composición. Sin embargo, la composición de la presente invención no está limitada a ello, sino que puede variar dependiendo del estado del paciente, el tipo de enfermedades y el grado de avance de las enfermedades.

La composición que comprende el compuesto según la presente invención puede comprender además un vehículo, excipiente o diluyente adecuados que se use generalmente en la preparación de composiciones farmacéuticas.

Ejemplos

En lo que sigue se describirá con más detalle la presente invención con referencia a ejemplos. Sin embargo, resultará obvio para los expertos en la materia que estos ejemplos tienen solo fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de derivados de verbenona

5 Reactivos e instrumentos

Se adquirieron en el comercio (1S)-(-)-verbenona de calidad reactivo, aldehídos, metilclorometiléter (MOM-Cl), diisopropiletilamina (DIPEA), hidróxido de potasio (KOH) y metóxido de sodio (NaOCH₃). Todos los reactivos y disolventes adquiridos tenían una elevada pureza y se utilizaron directamente sin purificación adicional, a excepción del diclorometano, que se destiló con hidróxido de calcio. Salvo que se especifique otra cosa, cada reacción se llevó a cabo en material de vidrio secado a la llama con vacío, bajo una atmósfera de nitrógeno seco. La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó utilizando gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ que se visualiza mediante luz UV, y la cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice (gel de sílice E. Merck, 70-230, 230-400 mallas). Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se obtuvieron utilizando un instrumento (Varian) a 500 MHz, y se determinaron los desplazamientos químicos en ppm desde el tetrametilsilano (TMS) como patrón interno (CDCl₃: *d* 7,26 ppm), y la constante de acoplamiento se registró en hercios. La multiplicidad se expresa utilizando las siguientes abreviaturas: singlete (s), doblete (d), doblete de dobletes (dd), doblete de doblete de dobletes (ddd), triplete (t), triplete de dobletes (td), doblete de tripletes (dt), cuarteto (q) y multiplete (m) y ancho (br). Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron con un instrumento (espectrómetro de masas Waters Q-TOF micro) y la rotación óptica se midió con un instrumento (polarímetro JASCO modelo IP-2000) a 589 nm. Se analizaron mediante HPLC en fase inversa en las condiciones siguientes todos los compuestos, y sus purezas fueron >95%: Método 1 (disolvente A: agua, disolvente B: acetonitrilo), caudal: 0,2 ml/min: 90% de B en 20 minutos; método 2 (disolvente A: agua, disolvente B: acetonitrilo), caudal: 1,0 ml/min: de 40% de B a 100% en 40 minutos. El suero fetal de bovino (FBS) utilizado se adquirió de una compañía (Hyclone, Logan, UT) y el medio neurobasal (NBM) y el suplemento B27 utilizados se adquirieron de una compañía (Invitrogen, Carlsbad, CA). Además, todos los productos químicos y reactivos utilizados se adquirieron de una compañía (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Ejemplo 1-1: Preparación de (1S,5R)-4-(4-(metoximetoxi)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

(compuesto **2a**)

Para obtener dieno a partir de (1S)-(-)-verbenona por condensación aldólica, se agitaron en MeOH (7 ml) (1S)-(-)-verbenona **1** (200 mg, 1,33 mmol) y 4-(metoximetoxi)benzaldehído (332 mg, 2,00 mmol) y se trataron con KOH (149 mg, 2,66 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 60 °C durante 6 horas, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió una pequeña cantidad de agua a la mezcla, que luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se concentró la mezcla a presión reducida para obtener un producto amarillo, que a continuación se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, obteniendo así (1S,5R)-4-(4-(metoximetoxi)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **2a**) en forma de un sólido amarillo (353 mg, rendimiento 89%). El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 88-90 °C;

[α]_D²⁰ -211,6° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz): *d* 7,45 (d, *J* = 8,80 Hz, 2H), 7,04 (d, *J* = 8,80 Hz, 2H), 6,81-6,92 (m, 2H), 5,90 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,48 (s, 3H), 3,03-3,17 (m, 1H), 2,91 (dt, *J* = 9,48, 5,53 Hz, 1H), 2,72 (t, *J* = 5,62 Hz, 1H), 2,12 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,01 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz): *d* 204,25, 164,57, 158,00, 134,51, 129,75, 128,73, 125,62, 121,83, 116,44, 94,171, 58,09, 56,09, 52,78, 43,59, 39,98, 26,72, 22,10

HRMS: valor calculado para C₁₇H₁₈O₂ (M-H) 253,1229, valor medido 253,1221

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100,0% (t_R = 3,67 min).

45 Ejemplo 1-2: Preparación de (1S,5R)-4-(3-metoxi-4,5-bis(metoxiestiril)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **2f**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se preparó (rendimiento: 90%) (1S,5R)-4-(3-metoxi-4,5-bis(metoximetoxi)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **2f**) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz): *d* 6,94(d, *J* = 1,96 Hz, 1H), 6,84 (s, 2H), 6,78 (d, *J* = 1,71 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 5,22 (s, 2H), 5,15 (s, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 3,09 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,90 (dt, *J* = 9,48, 5,53 Hz, 1H), 2,72 (td, *J* = 5,75, 1,47 Hz, 1H), 2,10 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,57 (s, 3H), 1,00 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 203,92, 164,02, 153,63, 151,19, 136,64, 134,76, 132,10, 126,91, 122,43, 108,91, 104,88, 98,37, 95,33, 58,19, 57,11, 56,07, 52,70, 43,78, 39,93, 26,70, 22,11.

Ejemplo 1-3: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3a**)

Para obtener dieno a partir de (1*S*)-(-)-verbenona por condensación aldólica, se añadió gota a gota HCl al 10% a una solución agitada de compuesto **2a** (200 mg, 0,67 mmol) en MeOH (3 ml) y se dejó reposar la mezcla de reacción durante una noche hasta que se completó la reacción. Se añadió entonces a la mezcla de reacción solución saturada de NaHCO₃, y después se extrajo con acetato de etilo y se secó con MgSO₄ anhidro. Se purificó mediante cromatografía en columna el material remanente para dar (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3a**) en forma de un sólido amarillo que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido (162 mg, rendimiento 95%) se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 88-90 °C.

[α]_D²⁰ -211,6° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,40 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H), 6,78-6,92 (m, 4H), 6,45 (s ancho, 1H), 5,91 (s, 1H), 3,12 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,88-2,95 (m, 1H), 2,74 (t, *J* = 5,62 Hz, 1H), 2,13 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 205,14, 165,56, 157,32, 135,24, 129,13, 128,51, 124,89, 121,29, 116,00, 58,10, 53,22, 43,86, 40,23, 26,79, 22,15;

HRMS: valor calculado para C₁₇H₁₈O₂ (M-H) 253,1229, valor medido 253,1221;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100,0% (t_R = 3,67 min).

Ejemplo 1-4: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3b**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (**3b**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 97%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 78-80 °C;

[α]_D²⁰ -140,0° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,45 (d, *J* = 8,07 Hz, 1H), 7,24 (d, *J* = 16,63 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 16,38 Hz, 1H), 6,42-6,48 (m, 2H), 5,88 (s, 1H), 3,86 (s, 3H), 5,64 (s ancho, 1H), 3,16 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,91 (dt, *J* = 9,35, 5,59 Hz, 1H), 2,72 (td, *J* = 5,60 Hz, 1H), 2,12 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 205,53, 166,76, 159,17, 158,94, 130,48, 128,48, 124,75, 120,62, 117,50, 108,19, 99,19, 58,10, 55,53, 53,25, 43,87, 40,33, 26,80, 22,16;

HRMS: valor calculado para C₁₈H₂₀O₃ (M+H) 285,1491, valor medido 285,1480;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 99,4% (t_R = 3,80 min).

Ejemplo 1-5: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3c**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (**3c**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 84%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 68-70 °C;

[α]_D²⁰ -208,6° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,13 (s, 1H), 6,70-6,96 (m, 4H), 5,92 (s, 1H), 3,12 (t, *J* = 5,50 Hz, 1H), 2,86-2,95 (m, 1H), 2,71-2,81 (m, 1H), 2,14 (d, *J* = 9,54 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,00 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 206,39, 166,93, 146,23, 144,51, 136,47, 128,75, 124,62, 121,91, 120,72, 115,38, 113,17, 60,55, 58,04, 53,84, 44,01, 40,55, 26,78, 22,12;

HRMS: valor calculado para C₁₇H₁₈O₃ (M-H) 269,1178, valor medido 269,1169;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100% (t_R = 3,47 min).

Ejemplo 1-6: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3d**)

5 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3d**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 95%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 238-240 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -181,4° (c 1,0, MeOH);

10 $^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , 500 MHz): δ 7,75 (d, J = 2,20 Hz, 1H), 7,45 (dd, J = 1,96, 8,56 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 8,56 Hz, 1H), 5,90 (s, 1H), 3,24 (t, J = 5,99 Hz, 1H), 2,97 (td, J = 5,59, 9,35 Hz, 1H), 2,62 (dt, J = 1,50, 6,00 Hz, 1H), 2,05 (d, J = 9,54 Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 0,98 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , 75 MHz): δ 203,02, 165,13, 155,42, 134,47, 132,29, 129,42, 128,79, 125,75, 121,59, 117,11, 110,36, 58,16, 52,33, 43,30, 26,83, 22,43;

15 HRMS: valor calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{BrO}_2$ (M+H) 333,0490, valor medido 333,0479;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 98,9% (t_R = 3,91 min).

Ejemplo 1-7: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3e**)

20 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3e**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 94%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 216-218 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -175,4° (c 1,0, MeOH);

25 $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): δ 7,28 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 6,12 (s, 2H), 5,73 (s, 1H), 3,80 (s, 6H), 3,10 (t, J = 5,38 Hz, 1H), 2,89 (td, J = 5,50, 9,05 Hz, 1H), 2,53 (t, J = 5,50 Hz, 1H), 1,93 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,53 (s, 3H), 0,91 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz): δ 202,56, 166,66, 160,48, 160,27, 126,68, 126,11, 119,22, 104,67, 92,17, 57,50, 55,71, 55,67, 51,67, 42,59, 26,42, 21,96;

30 HRMS: valor calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$ (M+H) 315,1596, valor medido 315,1583;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 99,3% (t_R = 3,70 min).

Ejemplo 1-8: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3f**)

35 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (**3f**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 92%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 168-170 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -158,8000° (c 1,0, MeOH);

40 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 6,78-6,82 (m, 3H), 6,64 (d, J = 1,47 Hz, 1H), 5,82-6,01 (m, 3H), 3,92 (s, 3H), 3,10 (t, J = 5,62 Hz, 1H), 2,91 (dt, J = 9,35, 5,59 Hz, 1H), 2,74 (td, J = 5,69, 1,59 Hz, 1H), 2,12 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 2,04 (s, 2H), 1,58 (s, 3H), 1,01 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 204,92, 165,07, 147,23, 144,24, 135,54, 134,13, 128,07, 125,50, 121,62, 108,63, 58,08, 56,25, 53,12, 43,75, 40,18, 26,78, 22,16;

45 HRMS: valor calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (M+H) 301,1440, valor medido 301,1453;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100% (t_R = 3,46 min).

Ejemplo 1-9: Preparación de (1*S*, 5*R*)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3g**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*, 5*R*)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3g**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 98%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 106-108 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -176,6° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7,21-7,26 (m, 1H), 7,01-7,05 (m, 2H), 6,92 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 6,83-6,86 (m, 1H), 6,46 (s, 1H), 5,96 (s, 1H), 3,11 (t, J = 5,75 Hz, 1H), 2,93 (td, J = 5,53, 9,48 Hz, 1H), 2,77 (dt, J = 1,59, 5,69 Hz, 1H), 2,14 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,01 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); δ 205,19, 165,18, 156,53, 137,42, 135,36, 130,03, 127,44, 122,37, 120,19, 116,68, 113,65, 58,17, 53,39, 43,89, 40,28, 26,77, 22,14;

HRMS: valor calculado para C₁₇H₁₈O₂ (M-H) 253,1229, valor medido 253,1228;

Resultado analítico por HPLC: (método 2) 99,3% (t_R = 3,73 min).

Ejemplo 1-10: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(2-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3h**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(2-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3h**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 100%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 140-142 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -296,6° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CD₃OD, 500 MHz); δ 7,56 (dd, J = 1,59, 7,70 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 16,14 Hz, 1H), 7,15 (dd, J = 1,59, 15,53 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 16,38 Hz, 1H), 6,80-6,87 (m, 2H), 5,89 (s, 1H), 3,25 (t, J = 5,87 Hz, 1H), 2,99 (dt, J = 5,53, 9,48 Hz, 1H), 2,65 (td, J = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,08 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,61 (s, 3H), 1,01 (s, 3H);

¹³C-RMN (CD₃OD, 75 MHz); δ 207,46, 169,09, 157,56, 133,10, 131,67, 128,67, 127,63, 124,55, 122,03, 121,07, 117,05, 59,62, 54,52, 45,29, 41,45, 27,19, 22,58;

HRMS: valor calculado para C₁₇H₁₈O₂ (M-H) 253,1229, valor medido 253,1218;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 99,4% (t_R = 3,80 min).

Ejemplo 1-11: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3i**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **3a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **3i**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 96%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -91,8° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 8,46 (s ancho, 1H), 7,37 (d, J = 8,56 Hz, 1H), 7,23 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 16,00 Hz, 1H), 6,42-6,55 (m, 2H), 6,04 (s, 1H), 3,78 (s, 3H), 3,20 (t, J = 5,38 Hz, 1H), 2,88-2,98 (m, 1H), 2,76 (t, J = 5,14 Hz, 1H), 2,17 (d, J = 9,54 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,05 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); δ 206,56, 167,94, 161,72, 156,99, 132,26, 130,09, 125,37, 119,93, 116,29, 106,90, 101,73, 57,96, 55,28, 53,74, 43,85, 40,60, 26,76, 22,13;

HRMS: valor calculado para C₁₈H₂₀O₃ (M+H) 285,1491, valor medido 285,1494;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 99,2% (t_R = 3,75 min).

Ejemplo 1-12: Preparación de (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-estirilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4a**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-

estirilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4a**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 92%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -91,8° (c 1,0, MeOH);

5 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz); δ 7,50 (d, J = 7,09 Hz, 2H), 7,35-7,40 (m, 2H), 7,33 (d, J = 7,34 Hz, 1H), 6,97 (d, J = 16,00 Hz, 1H), 6,92 (d, J = 16,00 Hz, 1H), 5,94 (s, 1H), 3,12 (td, J = 1,47, 5,87 Hz, 1H), 2,93 (dt, J = 5,62, 9,54 Hz, 1H), 2,74 (td, J = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,13 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz); δ 204,13, 164,23, 135,99, 134,96, 129,15, 128,88, 127,42, 127,35, 122,66, 58,23, 52,87, 43,76, 40,03, 26,78, 22,16;

10 HRMS: valor calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}$ (M+H) 239,1436, valor medido 239,1426;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 95,0% (t_R = 4,82 min).

Ejemplo 1-13: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4b**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4b**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 92%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -33,2° (c 1,0, MeOH);

20 $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz); δ 7,46-7,51 (m, 2H), 7,04-7,09 (m, 2H), 6,90 (d, J = 17,00 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 3,10 (td, J = 1,35, 5,81 Hz, 1H), 2,92 (dt, J = 5,62, 9,29 Hz, 1H), 2,74 (td, J = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,12 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz); δ 204,04, 164,03, 162,13, 133,62, 132,21, 129,04, 127,15, 122,61, 116,02, 58,17, 52,83, 43,72, 39,99, 26,73, 22,12;

HRMS: valor calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FO}$ (M+H) 257,1342, valor medido 257,1343;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 90,6% (t_R = 4,52 min).

25 Ejemplo 1-14: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4c**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4c**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 90%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

30 p. f. 138-140 °C;

$[\alpha]_D^{20}$ -172,0° (c 1,0, MeOH);

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz); δ 7,46 (d, J = 8,80 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 9,05 Hz, 2H), 6,90 (d, J = 15,90 Hz, 1H), 6,84 (d, J = 16,50 Hz, 1H), 5,90 (s, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,12 (td, J = 1,35, 5,81 Hz, 1H), 2,92 (dt, J = 5,53, 9,48 Hz, 1H), 2,73 (td, J = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,13 (d, J = 9,54 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,03 (s, 3H);

35 $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75 MHz); δ 204,17, 164,63, 160,50, 134,64, 128,83, 128,78, 125,25, 121,66, 114,35, 58,17, 55,34, 52,74, 43,76, 39,99, 26,76, 22,15;

HRMS: valor calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2$ (M+H) 269,1542, valor medido 269,1549;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100% (t_R = 4,58 min).

Ejemplo 1-15: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4d**)

40 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4d**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 92%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 148-150 °C;

45 $[\alpha]_D^{20}$ -152,4° (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,55-7,65 (m, 6H), 7,45 (t, *J* = 7,58 Hz, 2H), 7,34-7,39 (m, 1H), 7,01 (d, *J* = 16,50 Hz, 1H), 6,96 (d, *J* = 16,50 Hz, 1H), 5,95 (s, 1H), 3,14 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,94 (dt, *J* = 5,50, 9,54 Hz, 1H), 2,75 (t, *J* = 5,62 Hz, 1H), 2,14 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,03 (s, 3H);

5 ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 204,12, 164,23, 141,86, 140,23, 134,99, 134,50, 128,87, 127,84, 127,69, 127,51, 127,38, 126,94, 122,65, 58,24, 52,86, 43,77, 40,02, 26,79, 22,18;

HRMS: valor calculado para C₂₃H₂₂O (M+H) 315,1749, valor medido 315,1737;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 100% (*t*_R = 6,35 min).

Ejemplo 1-16: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(4-(1*H*-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

(compuesto **4e**)

10 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo el compuesto (1*S*,5*R*)-4-(4-(1*H*-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (**4e**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 41%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 146-148 °C;

15 $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -142,4^{\circ}$ (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,55 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H), 7,39 (d, *J* = 8,56 Hz, 2H), 7,12 (t, *J* = 2,20 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,36 (t, *J* = 2,20 Hz, 2H), 5,94 (s, 1H), 3,12 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,93 (td, *J* = 5,59, 9,35 Hz, 1H), 2,74 (dt, *J* = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,13 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,59 (s, 3H), 1,03 (s, 3H);

20 ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 203,97, 164,03, 140,92, 133,78, 133,21, 128,57, 127,14, 122,61, 120,25, 118,95, 110,94, 58,19, 25,79, 43,72, 39,97, 26,75, 22,14;

HRMS: valor calculado para C₂₁H₂₁NO (M+H) 304,1701, valor medido 304,1691;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 94,7% (*t*_R = 5,10 min).

Ejemplo 1-17: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4f**)

25 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4f**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 92%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} -111,2^{\circ}$ (c 1,0, MeOH);

30 ¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 7,02-7,09 (m, 2H), 6,89 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,86 (d, *J* = 7,00 Hz, 1H), 6,83 (d, *J* = 16,50 Hz, 1H), 5,91 (s, 1H), 3,93 (s, 3H), 3,91 (s, 3H), 3,11 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,91 (dtd, *J* = 1,47, 5,56, 9,41 Hz, 1H), 2,72 (tt, *J* = 1,74, 5,72 Hz, 1H), 2,11 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 204,03, 164,46, 150,28, 149,30, 134,89, 129,10, 125,42, 121,75, 111,24, 109,29, 58,19, 55,94, 52,69, 43,82, 39,96, 26,76, 22,15;

HRMS: valor calculado para C₁₉H₂₂O₃ (M+H) 299,1647, valor medido 299,1657;

35 Resultado analítico por HPLC: (método 2) 97,9% (*t*_R = 9,19 min).

Ejemplo 1-18: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4g**)

40 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4g**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 90%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} -94,2^{\circ}$ (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 6,93 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,65 (d, *J* = 2,20 Hz, 2H), 6,45 (t, *J* = 2,20 Hz, 1H), 5,94 (s, 1H), 3,82 (s, 6H), 3,10 (t, *J* = 5,75 Hz, 1H), 2,92 (dt, *J* = 5,62, 9,54 Hz, 1H), 2,74 (td, *J* = 1,59, 5,69 Hz, 1H), 2,12 (d, *J* = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

45 ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 204,04, 163,03, 161,03, 137,88, 134,93, 127,83, 122,81, 105,32, 101,51, 58,19, 55,40, 52,82, 43,73, 39,99, 26,73, 22,12;

HRMS: valor calculado para $C_{19}H_{22}O_3$ (M+H) 299,1647, valor medido 299,1662;

Método analítico de HPLC: (método 1) 100% (t_R = 4,58 min).

Ejemplo 1-19: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4h**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4h**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 93%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -94,8° (c 1,0, MeOH);

1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz); δ 7,29 (d, J = 16,38 Hz, 1H), 7,11 (d, J = 2,69 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 16,14 Hz, 1H), 6,81-6,88 (m, 2H), 5,92 (s, 1H), 3,84 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 3,16 (dt, J = 1,50, 6,00 Hz, 1H), 2,91 (td, J = 5,62, 9,29 Hz, 1H), 2,72 (dt, J = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,11 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 75 MHz); δ 204,16, 164,83, 153,74, 152,04, 129,50, 127,74, 125,62, 122,37, 115,85, 112,34, 111,85, 58,24, 56,13, 52,76, 43,76, 40,03, 26,76, 22,15;

HRMS: valor calculado para $C_{19}H_{22}O_3$ (M+H) 299,1647, valor medido 299,1650;

HPLC resultado analítico: (método 1) 96,4% (t_R = 4,69 min).

Ejemplo 1-20: Preparación de (1*S*,5*R*)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

(compuesto **4i**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **2a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **4i**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 97%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -71,6° (c 1,0, MeOH);

1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz); δ 7,66 (s, 1H), 7,36 (dd, J = 2,45, 8,80 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 16,38 Hz, 1H), 6,95 (d, J = 16,14 Hz, 1H), 6,77 (d, J = 8,80 Hz, 1H), 5,93 (s, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,12 (t, J = 5,62 Hz, 1H), 2,91 (dt, J = 5,35, 9,60 Hz, 1H), 2,73 (t, J = 5,14 Hz, 1H), 2,11 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,01 (s, 3H);

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 75 MHz); δ 203,97, 164,31, 156,40, 132,53, 129,53, 128,69, 128,09, 127,04, 122,89, 113,28, 112,75, 58,22, 55,77, 52,76, 43,71, 39,98, 26,73, 22,11;

HRMS: valor calculado para $C_{18}H_{19}BrO_2$ (M+H) 347,0647, valor medido 347,0651;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 99,0% (t_R = 6,23 min).

Ejemplo 1-21: Preparación de (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-2-il)vinil)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

(compuesto **5a**)

Para obtener dieno a partir de (1*S*)-(-)-verbenona por condensación aldólica, se agitaron en MeOH (7 ml) (1*S*)-(-)-verbenona **1** (200 mg, 1,33 mmol) y 2-piridincarboxaldehído (171 mg, 1,60 mmol) y se trataron con $NaOCH_3$ (solución al 25% en peso en MeOH). Se agitó la mezcla de reacción a 60 °C durante 6 horas, y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se añadió una pequeña cantidad de agua a la mezcla, que luego se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se concentró a presión reducida la mezcla, y se purificó mediante cromatografía en columna, obteniendo de ese modo (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-2-il)vinil)bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **5a**) en forma de un jarabe amarillo (258 mg, rendimiento 81%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

$[\alpha]_D^{20}$ -102,0000° (c 1,0, MeOH);

1H -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz); δ 8,60 (dd, J = 4,77, 0,61 Hz, 1H), 7,67 (td, J = 7,70, 1,71 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 15,90 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 7,83 Hz, 1H), 7,19 (ddd, J = 7,52, 4,83, 0,86 Hz, 1H), 6,96 (d, J = 15,89 Hz, 1H), 6,02 (s, 1H), 3,08-3,14 (m, 1H), 2,87-2,95 (m, 1H), 2,73 (td, J = 5,69, 1,59 Hz, 1H), 2,11 (d, J = 9,29 Hz, 1H), 1,57 (s, 3H), 1,00 (s, 3H);

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 75 MHz); δ 203,92, 163,51, 154,33, 149,96, 136,65, 133,90, 131,15, 124,29, 123,13, 58,27, 52,90, 43,86, 39,97, 26,71, 22,12;

HRMS: valor calculado para C₁₆H₁₇NO (M+H) 240,1388, valor medido 240,1392;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 98,4% (t_R = 4,28 min).

Ejemplo 1-22: Preparación de (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-3-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **5b**)

- 5 Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **5a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-3-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **5b**) en forma de un sólido amarillo (rendimiento: 77%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

p. f. 102-104 °C;

10 $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -204,0^{\circ}$ (c 1,0, MeOH); [A] 20 D -204,0 (c 1,0; MeOH)

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 8,70 (d, *J* = 1,96 Hz, 1H), 8,54 (dd, *J* = 1,22, 4,65 Hz, 1H), 7,85 (td, *J* = 1,86, 8,01 Hz, 1H), 7,31 (dd, *J* = 4,77, 7,95 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 16,00 Hz, 1H), 5,97 (s, 1H), 3,12 (dt, *J* = 1,10, 5,81 Hz, 1H), 2,94 (td, *J* = 5,62, 9,54 Hz, 1H), 2,76 (dt, *J* = 1,71, 5,75 Hz, 1H), 2,13 (d, *J* = 9,54 Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,03 (s, 3H);

15 ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 203,72, 163,28, 149,82, 149,35, 133,12, 131,73, 130,98, 129,34, 123,61, 58,23, 52,84, 43,64, 39,96, 26,72, 22,13;

HRMS: valor calculado para C₁₆H₁₇NO (M+H) 240,1388, valor medido 240,1397;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 98,7% (t_R = 3,89 min).

Ejemplo 1-23: Preparación de (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-4-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona

20 (compuesto **5c**)

Utilizando un método similar al método de preparación del compuesto **5a** se obtuvo (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-4-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (compuesto **5c**) en forma de un gel amarillo (rendimiento: 80%) que presentaba las características siguientes. El compuesto obtenido se utilizó como muestra en los ejemplos experimentales a continuación.

25 $[\alpha]^{20}_{\text{D}} -152,0^{\circ}$ (c 1,0, MeOH);

¹H-RMN (CDCl₃, 500 MHz); *d* 8,62 (d, *J* = 5,87 Hz, 2H), 7,35 (d, *J* = 5,87 Hz, 2H), 7,13 (d, *J* = 16,14 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 16,14 Hz, 1H), 6,01 (s, 1H), 3,10 (t, *J* = 5,87 Hz, 1H), 2,95 (td, *J* = 5,62, 9,54 Hz, 1H), 2,77 (dt, *J* = 1,59, 5,69 Hz, 1H), 2,13 (d, *J* = 9,54 Hz, 1H), 1,60 (s, 3H), 1,02 (s, 3H);

30 ¹³C-RMN (CDCl₃, 75 MHz); *d* 203,57, 162,78, 150,42, 143,12, 131,89, 131,57, 124,62, 121,23, 58,24, 52,90, 43,68, 39,95, 26,70, 22,11;

HRMS: valor calculado para C₁₆H₁₇NO (M+H) 240,1338, valor medido 240,1378;

Resultado analítico por HPLC: (método 1) 98,4% (t_R = 4,29 min).

Ejemplo 2: Efectos de derivados de verbenona sobre la excitotoxicidad, la actividad antioxidante y la isquemia cerebral focal

35 Preparación de animales de experimentación

Se adquirieron ratas SD (260-270 g, macho) de Charles River Laboratories (Seúl, Corea) y se aclimataron al ambiente, antes del experimento, con un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. A los animales se les permitió acceso *ad libitum* a agua potable, y el experimento se realizó bajo la aprobación de la Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio y el Comité institucional de cuidado y uso animal de la Universidad de Corea.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media ± EEM, y el análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA) y prueba de Bonferroni *post hoc*. Se consideró significativa *p* <0,05. Antes del análisis ANOVA, se determinó el valor *p* de la prueba de Levene para la igualdad de varianzas (*p* >0,05). En caso necesario, se analizaron adicionalmente los datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Mann-Whitney.

Ejemplo 2-1: Efecto de derivados de verbenona sobre la excitotoxicidad

Para examinar los efectos de las muestras obtenidas en los Ejemplos anteriores, sobre la excitotoxicidad, se llevó a cabo el siguiente experimento según el método publicado en la bibliografía (Ju C. *et al.*, BBRC, 431(3), 484-489, 2013)

(1) Cultivo de neuronas corticales

- 5 Se aislaron neuronas corticales (5×10^5 células/ml) a partir de ratas SD fetales (16-17 días). Específicamente, se cortó la corteza cerebral y se aislaron del tejido las células mediante trituración repetida por medio de una pipeta Pasteur en tampón (solución salina equilibrada de Hanks, HBSS). Se dispensó la suspensión de células ($1,8 \times 10^3$ células/mm²) en una placa previamente tratada con poli-D-lisina (100 mg/ml)/laminina (4 mg/ml). Se pusieron las células en medio NBM que contenía FBS al 10%, y se incubaron en una atmósfera de 96% de aire/5% de CO₂ a 37 °C. Tras 15-16 días de incubación, se realizó el experimento.

(2) Reoxigenación posterior a OGD (privación de oxígeno y glucosa)

- 15 Para inducir síntomas hipóxico-isquémicos *in vitro*, se colocaron las células incubadas en una cámara anóxica (presión parcial de oxígeno <2 mmHg). Se incubaron las células en DMEM exento de glucosa mientras se hacía burbujear una mezcla de gas anaeróbica (95% de N₂ y 5% de CO₂) durante 30 minutos para eliminar el oxígeno residual), y se incubaron a 37 °C durante 90 minutos para la privación de oxígeno. Al cabo de 90 minutos, se reemplazó la solución expuesta por medio que contenía glucosa DMEM 25 mmol/l para detener la reacción de OGD, y se devolvieron las células a las condiciones normales de oxígeno. Las células testigo no expuestas a OGD fueron incubadas en medio DMEM que contenía glucosa (25 mmol/L) y se les aportó una mezcla de gas aeróbica (95% de aire y 5% de CO₂). Se trataron las células con cada muestra 30 minutos antes, y durante todo el período de OGD/reoxigenación.

(3) Medida de la excitotoxicidad inducida por NMDA (N-metil-D-aspartato)

- 25 Después de ser incubadas en la placa durante 15-18 días, se expusieron las neuronas corticales a NMDA (100 mM) en una solución (solución salina equilibrada de Earle (EBSS) exenta de Mg²⁺; que contenía CaCl₂ 1,8 mM y glicina 10 mM) durante 10 minutos. Tras la exposición, se lavaron las células con solución de EBSS que contenía MgSO₄ y se incubaron en medio DMEM que contenía glucosa 25 mmol/l en una incubadora con 5% de CO₂, a 37 °C. 30 minutos antes del tratamiento con NMDA, se trataron las células con cada muestra (10 mM).

(4) Medición de la lesión celular o la muerte celular

- 30 Para medir la lesión celular o la muerte celular, se midió la cantidad de LDH liberada en el medio, utilizando un kit de medición de viabilidad celular (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de LDH en relación con el nivel de LDH celular total medido en cultivos hermanos lisados por congelación-descongelación después del experimento.

- 35 La excitotoxicidad es un factor importante en la muerte neuronal inducida por isquemia, en particular la isquemia cerebral temprana. La OGD es un modelo experimental que imita la interrupción abrupta del suministro sanguíneo y el consumo de energía en la isquemia. La lesión celular es inducida por OGD, y se pueden evaluar la lesión de la membrana celular y la lesión neuronal midiendo la liberación de una proteína tal como LDH al medio. En consecuencia, se observó que compuestos (**3a**, **3c** y **3f**) redujeron significativamente la lesión neuronal, de manera comparable a MK801 (antagonista ya bien conocido de receptor de NMDA), y no mostraron citotoxicidad (Figura 1). La excitotoxicidad causada por la estimulación excesiva de receptor de NMDA es un factor importante que está involucrado en la lesión neuronal durante OGD/R y la lesión cerebral isquémica resultante de la generación simultánea de radicales libres que conducen al estrés oxidativo. Los resultados de este experimento indicaron que los compuestos (**3a**, **3c**, **3f**, **3i** y **5a**) de la presente invención redujeron significativamente la lesión neuronal inducida por NMDA en células neuronales corticales cultivadas, aunque sus actividades eran más bajas que las actividades antiexcitotóxicas de MK-801 (Figura 2). Esto sugiere que la inhibición de la excitotoxicidad neuronal inducida por NMDA por parte de los compuestos de la presente invención contribuye a la actividad antiisquémica.

45 Ejemplo 2-2: Actividades antioxidantes de derivados de verbenona

Para examinar las actividades antioxidantes directas de las muestras obtenidas en los Ejemplos precedentes, se realizó el siguiente experimento de acuerdo con el método publicado en la bibliografía (Ju C. *et al.*, BBRC, 431(3), 484-489, 2013; Huang D. *et al.*, J. Agric. Food Chem., 53, 1841-1856, 2005).

(1) Medición (por fluorescencia de DCF) de niveles intracelulares de especies de oxígeno reactivas (ROS)

- 50 Para examinar las actividades de captación directa de radicales de las muestras, 1 hora después de la reoxigenación se tiñeron las células con la sonda fluorescente H₂DCF-DA (diacetato de 2,7-dihidroclorofluoresceína), que se utiliza ampliamente para medir el estrés oxidativo intracelular. Transcurridas 2 horas, se lavaron las células en tampón EBSS (que contenía glucosa 25 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgSO₄ 1,2 mM y probenecid 2,5 mM (pH 7,4)), y se midió la fluorescencia de DCF con un lector de microplacas por fluorescencia (SpectraMax GeminiEM; exc. = 485 nm, em. = 530 nm) o un microscopio de fluorescencia (DM IL HC Fluo, Leica, Wetzlar, Alemania) equipado con una

cámara digital (DFC420C, Leica, Wetzlar, Alemania). Se compensó la intensidad de fluorescencia con la autofluorescencia (es decir, la fluorescencia de las células no cargadas con H₂DCF-DA).

Los resultados de este experimento indicaron que los compuestos **3c** y **3f** reducían el estrés oxidativo intracelular inducido por OGD (Figura 3).

5 (2) Medida de la capacidad para captar radicales de nitrógeno (ensayo con DPPH)

Se mezclaron las muestras con DPPH (23,6 µg/ml, en etanol) y se incubaron en la oscuridad a 37 °C durante 30 minutos. Se midió a 517 nm la absorbancia de DPPH reducido por cada muestra. Se utilizó vitamina C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como testigo, y se calculó el valor de inhibición de DPPH (en %) empleando la siguiente ecuación:

10 Ecuación 1

$$\text{Actividad de captación (\%)} = [\text{Abs}_{\text{máx. (vit. C)}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}] / [\text{Abs}_{\text{máx. (vit. C)}} - \text{Abs}_{\text{mín. (vit. C)}}] \times 100.$$

(3) Medida de la capacidad de absorción de radical de oxígeno (ORAC)

Se realizó un ensayo ORAC como se describe en la literatura (Huang, D. *et al.*, J. Agric. Food Chem., 53, 1841-56, 2005).

- 15 Se prepararon AAPH (60 mM) y fluoresceína (50 nM) en tampón (tampón de fosfato 75 mM, pH 7,4) sin muestra o con una muestra o un estándar (Trolox). Se suspendieron cada una de las muestras y el estándar en una solución de RMCD (beta-ciclodextrina metilada aleatoriamente) al 7% en acetona al 50%. Se utilizó RMCD para aumentar la solubilidad de las muestras liposolubles. Se mezcló suficientemente cada muestra con solución de fluoresceína (66 nM, 190 µl) con agitación por sacudidas durante 5 segundos. Después de incubar a 37 °C durante 10 minutos, se
- 20 añadió rápidamente AAPH (500 mM, 30 µl) a cada muestra, y se midió la disminución de la fluorescencia utilizando un lector de microplacas por fluorescencia (exc. = 485 nm, em. = 530 nm; SpectraMax GeminiEM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 37 °C, a intervalos de 5 minutos durante 9 horas. Para cuantificar la actividad de captación de radicales peroxilo, se calculó la AUC (área bajo la curva) según la Ecuación 2 siguiente, se calculó la AUC neta según la Ecuación 3 siguiente y se calcularon los ET (equivalentes de Trolox) de cada muestra según la
- 25 Ecuación 4 siguiente, basándose en una curva estándar de AUC neta trazada en función un aumento en la concentración de Trolox.

Ecuación 2

$$\text{AUC} = (0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{n-2}/f_0 + f_{n-1}/f_0 + f_n/f_0) \times 5,$$

donde f_0 es la primera fluorescencia a 0 minutos y tiempo t .

30 Ecuación 3

$$\text{AUC neta} = \text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{blanco}}$$

Ecuación 4

$$\text{ET (equivalentes de Trolox) de cada muestra} = [\text{AUC neta}_{\text{muestra a 25 mM}}] / [\text{AUC neta}_{\text{Trolox a 25 mM}}]$$

- 35 Las actividades antioxidantes de los derivados de verbenona de la presente invención se midieron mediante las siguientes dos reacciones químicas distintas: (1) un ensayo basado en transferencia de electrón único, que es un ensayo con 2,2-di(4-terc.-octilfenil)-1-picrilhidrazilo [DPPH] que mide una disminución en la actividad de DPPH como generador de radicales libres y una sonda de terminación; y (2) un ensayo de transferencia de átomo de hidrógeno que es un ensayo de capacidad de absorción de radicales libres de oxígeno [ORAC] que mide la cinética de reacción competitiva de un generador de radical peroxilo (AAPH; dihidrocloruro de 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)) y cada muestra actúa como un antioxidante con respecto a la sonda fluorescente oxidable (fluoresceína).
- 40

- Los resultados de este experimento indicaron que, en el ensayo con DPPH, la mayoría de los derivados de estirilo (**3a-f** y **3h-i**) que tenían un grupo fenol mostraron una intensa y directa actividad de captación contra la conversión de DPPH a radicales libres de nitrógeno orgánico (véase la Tabla 1). Entre ellos, los compuestos **3c** y **3f** mostraron una actividad de captación más intensa en comparación con la vitamina C a la misma concentración. En el ensayo
- 45 ORAC se demostró que el compuesto (**4e**), que tiene un grupo pirrol, y los compuestos (**3a-i**), que tienen un grupo fenol, mostraron todos ellos intensas actividades de captación de radicales peroxilo en comparación con Trolox (véanse las Tablas 1 y 2). Además, se halló que la introducción de un grupo hidroxilo en las posiciones meta y para del grupo fenilo aumentaba la actividad de captación de radicales libres de cada compuesto.

Tabla 1

Fórmula 2						Ensayo con DPPH	Ensayo ORAC	
código	producto					% de inhibición ^a	AUC neta ^b	ET ₂₅ ^b
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅			
3a	H	H	OH	H	H	19,11 ± 0,67	153,98 ± 1,68	3,43 ± 0,04
3b	OCH ₃	H	OH	H	H	38,13 ± 5,62	106,48 ± 1,89	2,37 ± 0,04
3c	H	OH	OH	H	H	91,62 ± 3,27	131,29 ± 11,97	3,11 ± 0,11
3d	H	Br	OH	H	H	29,45 ± 2,41	168,12 ± 5,24	3,74 ± 0,12
3e	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	55,80 ± 7,52	166,26 ± 6,05	3,70 ± 0,13
3f	H	OH	OH	OCH ₃	H	83,64 ± 6,19	99,06 ± 37,80	2,83 ± 0,22
3g	H	OH	H	H	H	no determinado	73,74 ± 3,86	1,64 ± 0,09
3h	OH	H	H	H	H	4,64 ± 0,60	98,77 ± 2,53	2,20 ± 0,06
3i	OH	H	OCH ₃	H	H	51,21 ± 3,83	136,87 ± 3,24	3,05 ± 0,07
4a	H	H	H	H	H	no determinado	27,73 ± 0,74	0,61 ± 0,01
4b	H	H	F	H	H	no determinado	26,15 ± 1,26	0,62 ± 0,02
4c	H	H	OCH ₃	H	H	no determinado	38,06 ± 2,00	0,79 ± 0,01
4d	H	H	Ph	H	H	no determinado	26,75 ± 1,27	0,56 ± 0,01
4e	H	H	pirrol	H	H	no determinado	98,31 ± 0,48	2,19 ± 0,01
4f	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	no determinado	39,35 ± 1,67	0,88 ± 0,04
4g	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H	no determinado	45,28 ± 0,62	1,01 ± 0,01
4h	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	no determinado	32,44 ± 1,54	0,72 ± 0,03
4i	OCH ₃	H	H	Br	H	no determinado	32,96 ± 1,03	0,73 ± 0,02

Fórmula 2

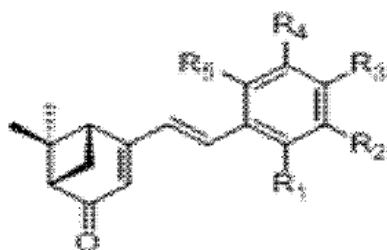
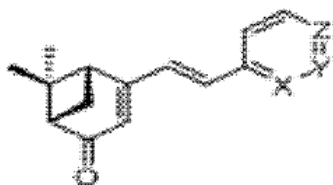


Tabla 2

Fórmula 3						Ensayo con DPPH	Ensayo ORAC	
código	producto					% de inhibición ^a	AUC neta ^b	ET ₂₅ ^b
		X	Y	Z				
5a		N	C	C		no determinado	23,51 ± 0,79	0,52 ± 0,02
5b		C	N	C		no determinado	22,93 ± 0,61	0,51 ± 0,01
5c		C	C	N		no determinado	22,51 ± 0,34	0,50 ± 0,01

Fórmula 3



5 Ejemplo 2-3: Experimento en modelo de isquemia cerebral focal

Para examinar los efectos sobre la isquemia cerebral focal de las muestras obtenidas en los Ejemplos precedentes, se realizó el siguiente experimento de acuerdo con el método publicado en la bibliografía (Belayev L. *et al.*, Stroke, 27, 1616-1622, 1996, discusión 1623).

(1) Modelo de isquemia cerebral focal

- 10 Se anestesiaron ratas con isoflurano al 3,0% en mezcla N₂O y O₂ (70:30 v/v) mediante mascarilla facial y se mantuvieron con isoflurano al 2%. Durante todo el período experimental, se controló la temperatura corporal y se mantuvo a 37 °C ± 0,3 °C utilizando un termómetro rectal y una almohadilla térmica, hasta que los animales se recuperaron lo suficiente de la anestesia después de la cirugía. Se produjo isquemia cerebral focal mediante MCAO endovascular en el lado derecho. En pocas palabras, se insertó una sutura de nailon monofilamento 3-0 con extremo
- 15 hacho romo por calor (Ethicon Johnson & Johnson, Bruselas, Bélgica) en la luz del muñón de la arteria carótida externa derecha y se hizo avanzar 17,5 mm en la arteria carótida interna para ocluir el ostium de la MCA. Se retiró la sutura al cabo de 1,5 horas para permitir que los animales se recuperasen. A los testigos operados se les sometió a los mismos procedimientos quirúrgicos, salvo la MCAO. Se midieron los valores fisiológicos 15 minutos antes de la MCAO y 15 minutos después de la reperusión, y se monitorizó la presión arterial media durante 5 minutos utilizando
- 20 un analizador de presión arterial (MicroMed, Louisville, KY) y se monitorizó la glucosa utilizando un analizador (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA). Se disolvió una muestra al 5% (compuesto 3f) en DMSO, se diluyó con Cremophor al 10% y solución salina estéril, y se administró por vía intraperitoneal a ratas desde 2 horas después de la inducción de MCAO (100 mg/kg).

(2) Medición del volumen de infarto

- 25 Se anestesiaron ratas con hidrato de cloral al 3,5% (5 ml/kg, inyección intraperitoneal) y se decapitaron. Se tiñeron con cloruro de trifeniltetrazolio al 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 37 °C, durante 30 minutos, secciones coronales de cerebro (2 mm) obtenidas utilizando una matriz (matriz cerebral de rata, Ted Pella, Redding, CA), se fijaron con paraformaldehído al 4% (pH 7,4), y posteriormente se crioprotegieron en tampón de fosfato que contenía sacarosa al 30%, a 4 °C, durante 2 días. El área de la sección transversal del infarto, entre los niveles de bregma de
- 30 +4 mm (anterior) y -6 mm (posterior), se determinó con *software* de análisis (programa de análisis de imagen OPTIMAS 5.1, BioScan Inc. Edmonds, WA). El tamaño del infarto cerebral se midió manualmente trazando los márgenes de las zonas de infarto. El volumen total del infarto (en mm³) se calculó según la Ecuación 5 siguiente tal como se describe en documentos (J Neurosci Methods (1998) 84:9-16; J Cereb Blood Flow Metab (1990) 10:290-293), y se compensó en cuanto al edema cerebral. El edema cerebral se determinó por el aumento porcentual del
- 35 área del hemisferio contralateral/ipsilateral tal como se muestra en la Ecuación 6 siguiente. Todas las mediciones se realizaron de forma doble ciego.

Ecuación 5

Volumen total del infarto (mm^3) = volumen ipsilateral (IVd) obtenido por medición directa $\times$ [(volumen contralateral (V_c))/volumen ipsilateral (V_i)]

Ecuación 6

- 5 Volumen de edema (%) = [(volumen ipsilateral (V_i) - volumen contralateral (V_c))/ volumen contralateral (V_c)] $\times$ 100.

Después de ello se congelaron los tejidos, se cortaron en secciones coronales de 10 o 30 μm y se conservaron a -20 °C.

(3) Medida de la pérdida neurológica

- 10 Se midió la pérdida neurológica a las 24 horas después de la isquemia y se calificó en una escala de 4 puntos como se describe en la bibliografía (0: sin pérdida neurológica, 1: pata doblada, 2: pata doblada, resistencia reducida a la fuerza que empuja el costado, y no girada; 3: lo mismo que 2, pero girada).

(4) Tinción inmunohistológica del tejido cerebral

- 15 Se trataron las secciones de tejido cerebral preparadas como se ha descrito en lo que antecede, con tampón que contenía suero al 5%, a temperatura ambiente y durante 1 hora, para inhibir la fijación no específica de anticuerpo. Se añadieron anticuerpos primarios diluidos a concentraciones adecuadas (anticuerpo MPO y anticuerpo ED-1, cada uno 1:100; anticuerpo de nitrotirosina, 1:50; IL-1a, IL-1b, anticuerpos contra TNF-a, 1:100) a las secciones de tejido, que luego se tiñeron durante una noche a 4 °C. Se eliminó por lavado el anticuerpo primario no fijado, y después se tiñeron con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia las secciones de tejido, a temperatura ambiente y durante 1 hora. Se eliminó por lavado el anticuerpo secundario no fijado, y después se tiñó el núcleo con colorante Hoechst 33258 durante 20 minutos, seguido de lavado. Se montaron las secciones en un portaobjetos de vidrio, y después se observaron con un microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss LSM510; Zeiss, Oberkochen, Alemania).
- 20

(5) Experimento sobre la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

- 25 El colorante de tinción (azul de Evans, al 2%) se une a la albúmina sérica inmediatamente después de la inyección intravenosa y se convierte en un material de alto peso molecular incapaz de atravesar una barrera hematoencefálica normal, pero en tejido cerebral de rata en donde se ha inducido isquemia cerebral, la permeabilidad del azul de Evans se incrementa debido al daño de la barrera hematoencefálica, y así aumenta la cantidad de tinción con azul de Evans. Se perfundió con 200 ml de solución salina fisiológica el corazón de las ratas con isquemia cerebral focal inducida como se ha descrito en lo que antecede. Se extrajo el tejido cerebral, se pesó y se mantuvo en un reactivo (ácido tricloroacético al 60%) a 4 °C durante 24 horas. Se trituró el tejido y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos, y se recogió el sobrenadante. Se midió a 610 nm la absorbancia del azul de Evans en el tejido cerebral y se calculó como cantidad de colorante por gramo de tejido.
- 30

(6) Experimento sobre la tasa de supervivencia a largo plazo

- 35 En ratas con isquemia cerebral focal inducida como se ha descrito en lo que antecede, se midieron durante 3 semanas la tasa de supervivencia y el déficit neurológico, en las mismas condiciones que antes de la cirugía.

(7) Modelo animal de accidente cerebrovascular isquémico embólico

- Se anestesiaron ratas (peso: 270-300 g) con isoflurano al 3,0% en una mezcla de 70% de N_2O /30% de O_2 (70:30 v/v) y se mantuvieron con isoflurano al 3%. Se insertó un termómetro rectal en cada rata, y se mantuvo en 37,0 ~ 37,9 °C la temperatura corporal de las ratas utilizando una almohadilla térmica automática conectada al termómetro. Se incidió la línea media del cuello, se separaron la arteria carótida común (CCA) derecha, la arteria carótida externa derecha (ECA) y la arteria carótida interna derecha (ICA), y se ligaron la arteria carótida externa y la arteria carótida común. Se tensó temporalmente la arteria carótida interna utilizando una pinza microvascular flexionada. Se efectuaron incisiones en las ramas que partían de la arteria carótida externa y la arteria carótida interna, y se inyectó un émbolo de 35 mm en la arteria carótida interna con una jeringa Hamilton de 100 μl , utilizando un catéter PE-50 modificado (diámetro externo: 0,58 mm; diámetro de la entrada: 0,3 mm, adecuado para inyección intravascular). Se retiró la pinza microvascular y se hizo avanzar cuidadosamente el catéter 16-17 mm en la arteria carótida interna y se movió hasta un punto correspondiente a aproximadamente 2 mm desde el punto inicial de la arteria cerebral media. Se inyectó el émbolo del catéter en la arteria carótida interna (10 μl). Transcurridos 5 minutos después de la inyección del émbolo, se retiró el catéter. Se ligó la rama de la arteria carótida interna y se suturó el sitio de la incisión, y después se dejaron reposar las ratas hasta que se recuperaron de la anestesia. El émbolo utilizado en el experimento se obtuvo mediante la inyección rápida de sangre arterial femoral (obtenida de ratas donantes) en un tubo PE-50 y dejando reposar la sangre a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 4 °C durante 22 horas, con el fin de producir trombos. Antes del experimento, se cortó el tubo y se transfirieron los trombos a un catéter PE-
- 40
- 45
- 50

50 modificado, a través de un tubo PE-10 y utilizando una jeringa de 1 ml que contenía solución salina, equipada con una aguja 23G.

Los resultados del experimento indicaron que, en el modelo de rata con isquemia transitoria inducida, el tratamiento posisquémico con la muestra **3f** (50 mg/kg) (inyección intraperitoneal, administrada dos veces (en concreto, 2 horas y 7 horas después del infarto cerebral)) redujo significativamente la lesión isquémica, el edema cerebral y el déficit neurológico (Figura 4). Además, cuando se midió la actividad antioxidante en el tejido mediante la tinción inmunohistológica para nitrotirosina en las secciones de tejido cerebral obtenidas de las ratas a las que se habían administrado las muestras, se demostró que se había incrementado significativamente la actividad antioxidante en el tejido cerebral del grupo tratado con muestra (Figura 5).

Paralelamente, cuando se examinó mediante tinción inmunológica la infiltración de células inflamatorias en zonas de infarto cerebral y zonas lesionadas del cerebro, se observó que se había inhibido significativamente la migración de neutrófilos/monocitos teñidos con anticuerpo MPO y microglia/macrófagos teñidos con anticuerpo ED-1 (Figura 6). Además, se halló que los niveles de expresión de citocinas (tales como IL-1 alfa, IL-1 beta y TNF-alfa, que se sabe que desempeñan un papel importante en la lesión isquémica) en el tejido habían disminuido significativamente en el grupo al que se habían administrado las muestras (Figura 7). Además, se halló que los compuestos de la presente invención redujeron significativamente la permeabilidad de la barrera hematoencefálica que se había incrementado a causa de la lesión isquémica (Figura 8). Además, cuando se observaron los efectos de las muestras (compuestos) de la presente invención sobre la tasa de supervivencia a largo plazo y la recuperación neurológica durante 3 semanas después de la administración de las muestras a los modelos de rata con isquemia temporal inducida, se halló que la tasa de supervivencia a largo plazo y la recuperación neurológica de las ratas a las que se habían administrado las muestras habían aumentado significativamente (Figura 9). En el caso del accidente cerebrovascular isquémico, con frecuencia ocurre un aumento en el sangrado debido a un fármaco (por ejemplo, tPA), que puede aumentar los efectos secundarios clínicos (por ejemplo, muerte o mal pronóstico) en los pacientes. Sin embargo, las muestras de la presente invención no influyeron significativamente en el tamaño de la lesión cerebral inducida por sangre autóloga en los modelos animales *in vivo* con accidente cerebrovascular embólico, sugiriendo que existe una baja posibilidad de que las muestras de la presente invención originen tales efectos secundarios (Figura 10).

En lo que sigue se describirán ejemplos de formulación de un compuesto que contiene el compuesto de la presente invención, pero estos ejemplos de formulación tienen solo fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo de formulación 1: Preparación de polvo

Compuesto 3f	200 mg
Lactosa	100 mg
Talco	10 mg

Se mezclan entre sí los compuestos precedentes y se introducen en una bolsita hermética para preparar una formulación en polvo.

Ejemplo de formulación 2: Preparación de comprimido

Compuesto 3c	200 mg
Almidón de maíz	100 mg
Lactosa	100 mg
Estearato de magnesio	2 mg

Se mezclan entre sí los compuestos precedentes y luego se comprimen para dar un comprimido conforme a un método convencional, preparando de este modo una formulación en comprimido.

Ejemplo de formulación 3: Preparación de cápsula

RW	200 mg
Celulosa cristalina	3 mg
Lactosa	14,8 mg
Estearato de magnesio	0,2 mg

Conforme a un método convencional de preparación de cápsulas, se mezclaron entre sí los componentes precedentes y con ello se llenó una cápsula de gelatina, preparando de este modo una formulación en cápsula.

Ejemplo de formulación 4: Preparación de solución inyectable

Compuesto 4e	200 mg
Manitol	180 mg
Agua destilada estéril inyectable	2.974 mg
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	26 mg

5

Conforme a un método convencional de preparación de solución inyectable, con una mezcla de los componentes precedentes se llenó cada una de las ampollas (2 ml).

Ejemplo de formulación 5: Preparación de formulación líquida

Compuesto 5a	200 mg
Azúcar isomerizado	10 g
Manitol	5 g
Agua purificada	c. s.

- 10 Conforme a un método convencional para preparar una formulación líquida, se disolvió en agua purificada cada uno de los componentes anteriores, y se añadió a ello aroma de limón. Después se agregó agua purificada a la mezcla hasta un volumen total de 100 ml y con la solución se llenó un frasco topacio y se esterilizó, preparando de este modo una formulación líquida.

Ejemplo de formulación 6: Preparación de alimento funcional para la salud

Compuesto 3a	1.000 mg
Mezcla de vitaminas	c. s.
Acetato de vitamina A	70 µg
Vitamina E	1,0 mg
Vitamina B1	0,13 mg
Vitamina B2	0,15 mg

Compuesto 3a	1.000 mg
Vitamina B6	0,5 mg
Vitamina B12	0,2 µg
Vitamina C	10 mg
Biotina	10 µg
Amida de ácido nicotínico	1,7 mg
Ácido fólico	50 µg
Pantotenato de calcio	0,5 mg
Mezcla de minerales	c. s.
Sulfato ferroso	1,75 mg
Óxido de cinc	0,82 mg
Carbonato de magnesio	25,3 mg
Fosfato monobásico de potasio	15 mg
Fosfato dibásico de calcio	55 mg
Citrato de potasio	90 mg
Carbonato de calcio	100 mg
Cloruro de magnesio	24,8 mg

- 5 Los contenidos de los componentes en cada una de las mezclas de vitaminas y minerales son contenidos relativamente adecuados para alimentos funcionales para la salud, pero pueden modificarse a cualquier otro valor. Conforme a un método convencional para preparar alimentos funcionales para la salud, se mezclan entre sí los componentes precedentes y luego se granulan, y los gránulos se pueden emplear en la preparación de alimentos funcionales para la salud conforme a un método convencional.

Ejemplo de formulación 7: Preparación de bebida funcional para la salud

Compuesto 3f	1.000 mg
Ácido cítrico	1.000 mg
Oligosacárido	100 g
Concentrado de ciruela	2 g
Taurina	1 g
Agua purificada	hasta 900 ml

Conforme a un método convencional para preparar bebidas funcionales para la salud, se mezclan entre sí los componentes precedentes, y luego se agitan y se calientan a 85 °C durante aproximadamente 1 hora. Después se filtra la solución, con ella se llena un recipiente esterilizado de 2 l, se cierra de manera estanca, se almacena en frío, y luego se usa en la preparación de la bebida funcional para la salud de la presente invención.

- 5 La relación de composición arriba descrita es relativamente adecuada para bebidas favoritas, pero puede variar de acuerdo con las preferencias del lugar y étnicas, tales como el estamento del consumidor, los países consumidores, el uso previsto y similares.

Aplicabilidad industrial

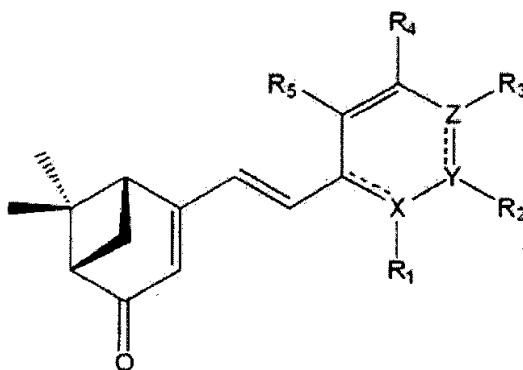
- 10 Como se ha descrito en lo que antecede, la composición farmacéutica que contiene un derivado de verbenona como ingrediente activo muestra efectos en la protección de neuronas, la inhibición de la excitotoxicidad inducida por NMDA, la inhibición del estrés oxidativo intracelular y la inhibición de la migración de células inflamatorias, en comparación con composiciones farmacéuticas convencionales. Por lo tanto, tiene los efectos de tratar enfermedades cerebrales degenerativas, específicamente la lesión cerebral isquémica. Además, también se puede usar en alimentos funcionales para la salud.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un derivado de verbenona representado por la siguiente Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo para uso en un método para prevenir o tratar una enfermedad cerebral degenerativa:

Fórmula 1



en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C_1-C_3 , un grupo alcoxi C_1-C_3 , un grupo amino, un grupo alquilamina C_1-C_3 , un grupo alquildiamina C_1-C_3 , un anillo aromático C_5-C_8 , un anillo cíclico C_5-C_8 y un anillo heteroaromático C_5-C_8 ;

X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, un átomo de carbono o al menos un heteroátomo seleccionado del grupo consistente en átomos de N, O y S; y

----- indica un enlace doble o un enlace sencillo.

2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo amino, un anillo aromático C_5-C_6 , un anillo cíclico C_5-C_6 y un anillo heteroaromático C_5-C_6 .

3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo metoxi, un grupo fenilo, un grupo pirrol y un grupo piridina.

4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde los X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, al menos un átomo seleccionado del grupo consistente en un átomo de carbono y un átomo de N.

5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición comprende un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

(1S,5R)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3a);

(1S,5R)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3b);

(1S,5R)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3c);

(1S,5R)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3d);

(1S,5R)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3e);

(1S,5R)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3f);

(1S,5R)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3g);

(1S,5R)-4-(2-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3h);

(1S,5R)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3i);

(1S,5R)-6,6-dimetil-4-estirilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4a);

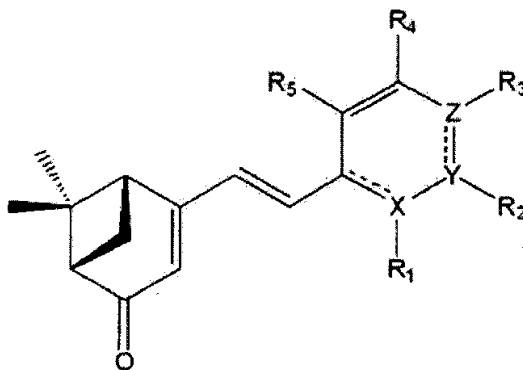
- (1*S*,5*R*)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4b);
 (1*S*,5*R*)-4-(4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4c);
 (1*S*,5*R*)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4d);
 (1*S*,5*R*)-4-(4-(1*H*-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4e);
 5 (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4f);
 (1*S*,5*R*)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4g);
 (1*S*,5*R*)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4h);
 (1*S*,5*R*)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4i);
 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-2-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5a);
 10 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-3-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5b); y
 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-4-il)-vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5c).

6. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad cerebral degenerativa es accidente cerebrovascular, parálisis, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

- 15 7. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad cerebral degenerativa es accidente cerebrovascular.

8. Un alimento funcional para la salud que comprende un derivado de verbenona representado por la siguiente Fórmula 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como ingrediente activo para uso en un método para prevenir o mejorar una enfermedad cerebral degenerativa:

- 20 Fórmula 1



- 25 en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo C₁-C₃, un grupo alcoxi C₁-C₃, un grupo amino, un grupo alquilamina C₁-C₃, un grupo alquildiamina C₁-C₃, un anillo aromático C₅-C₈, un anillo cíclico C₅-C₈ y un anillo heteroaromático C₅-C₈;

X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, un átomo de carbono o al menos un heteroátomo seleccionado del grupo consistente en átomos de N, O y S; y

----- indica un enlace doble o un enlace sencillo.

- 30 9. El alimento funcional de la salud para el uso según la reivindicación 8, en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo amino, un anillo aromático C₅-C₆, un anillo cíclico C₅-C₆ y un anillo heteroaromático C₅-C₆.

- 35 10. El alimento funcional de la salud para el uso según la reivindicación 9, en donde R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ son cada uno, de manera independiente, al menos uno seleccionado del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno seleccionado de F, Cl, Br e I, un grupo hidroxilo, un grupo metilo, un grupo metoxi, un grupo fenilo, un grupo pirrol y un grupo piridina.

11. El alimento funcional para la salud para el uso según la reivindicación 8, en donde los X, Y y Z son cada uno, de manera independiente, al menos un átomo seleccionado del grupo consistente en un átomo de carbono y un átomo de N.

5 12. El alimento funcional para la salud para el uso según la reivindicación 8, en donde el alimento funcional para la salud comprende un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

(1S,5R)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3a);

(1S,5R)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3b);

(1S,5R)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3c);

(1S,5R)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3d);

10 (1S,5R)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3e);

(1S,5R)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3f);

(1S,5R)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3g);

(1S,5R)-4-(2-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3h);

(1S,5R)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3i);

15 (1S,5R)-6,6-dimetil-4-estirilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4a);

(1S,5R)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4b);

(1S,5R)-4-(4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4c);

(1S,5R)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4d);

(1S,5R)-4-(4-(1H-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4e);

20 (1S,5R)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4f);

(1S,5R)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4g);

(1S,5R)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4h);

(1S,5R)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4i);

(1S,5R)-6,6-dimetil-4-((E)-2-(piridin-2-il)vinil)bicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5a);

25 (1S,5R)-6,6-dimetil-4-((E)-2-(piridin-3-il)vinil)bicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5b); y

(1S,5R)-6,6-dimetil-4-((E)-2-(piridin-4-il)-vinil)bicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5c).

13. El alimento funcional para la salud para el uso según la reivindicación 8, en donde la enfermedad cerebral degenerativa es accidente cerebrovascular, parálisis, demencia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington.

30 14. El alimento funcional para la salud para el uso según la reivindicación 13, en donde la enfermedad cerebral degenerativa es accidente cerebrovascular.

15. Un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

(1S,5R)-4-(4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3a);

(1S,5R)-4-(4-hidroxi-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3b);

35 (1S,5R)-4-(3,4-dihidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3c);

(1S,5R)-4-(3-bromo-4-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3d);

(1S,5R)-4-(4-hidroxi-2,6-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3e);

(1S,5R)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3f);

(1S,5R)-4-(3-hidroxiestiril)-6,6-dimetilbicio[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3g);

- (1*S*,5*R*)-4-(2-hidroxi-4-metoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3i);
 (1*S*,5*R*)-4-(4-fluoroestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4b);
 (1*S*,5*R*)-4-(2-(bifenil-4-il)vinil)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4d);
 (1*S*,5*R*)-4-(4-(1H-pirrol-1-il)estiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4e);
 5 (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4f);
 (1*S*,5*R*)-4-(3,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4g);
 (1*S*,5*R*)-4-(2,5-dimetoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4h);
 (1*S*,5*R*)-4-(5-bromo-2-metoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (4i);
 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-2-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5a);
 10 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-3-il)vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5b); y
 (1*S*,5*R*)-6,6-dimetil-4-((*E*)-2-(piridin-4-il)-vinil)biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (5c); y
 sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
16. El compuesto según la reivindicación 15, que es (1*S*,5*R*)-4-(3,4-dihidroxi-5-metoxiestiril)-6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (3f) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

FIG. 1

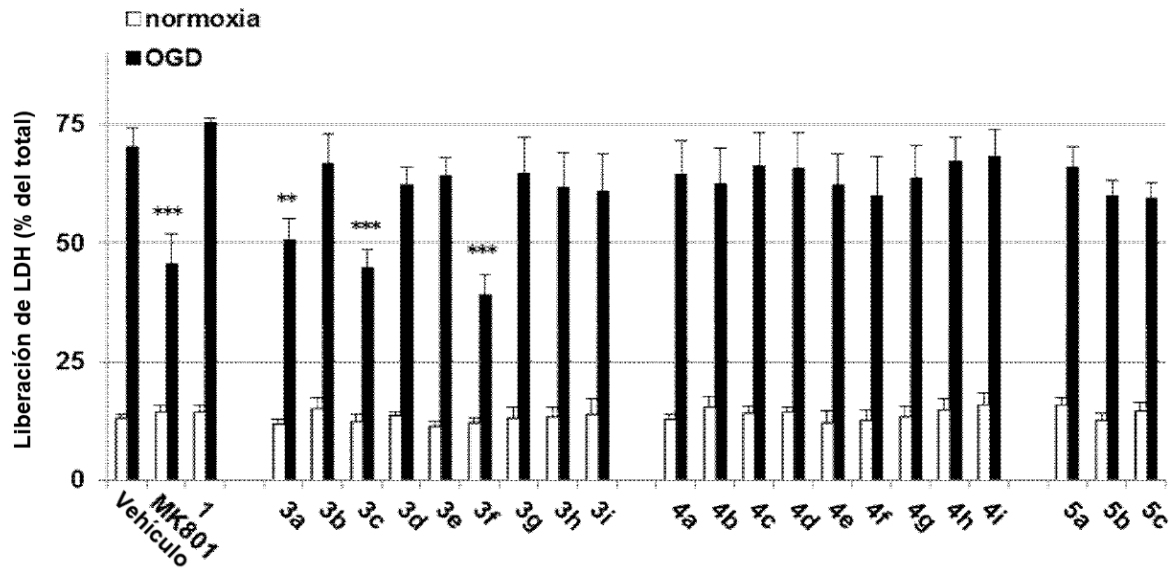


FIG. 2

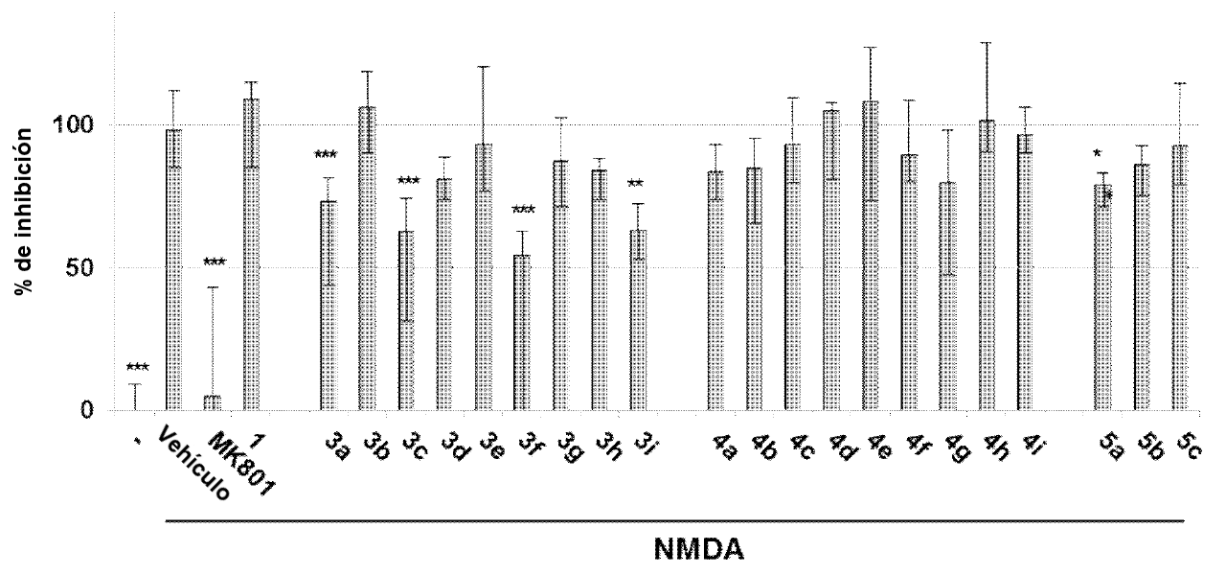
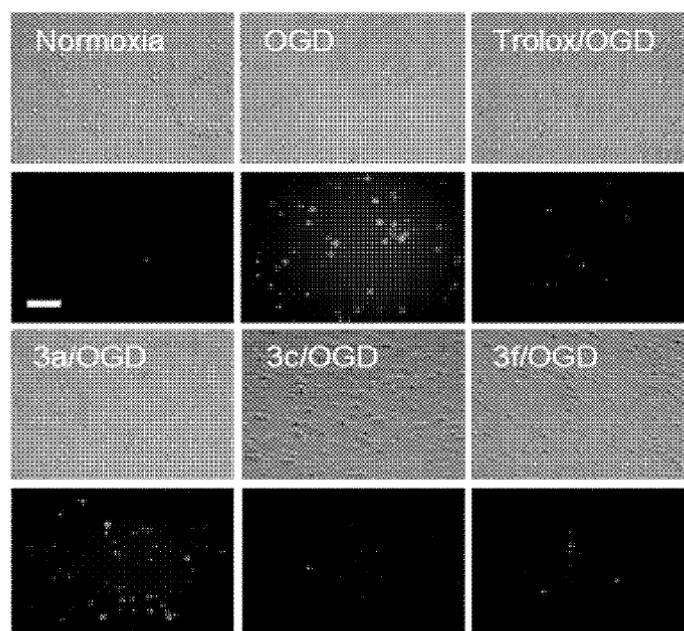


FIG. 3

A



B

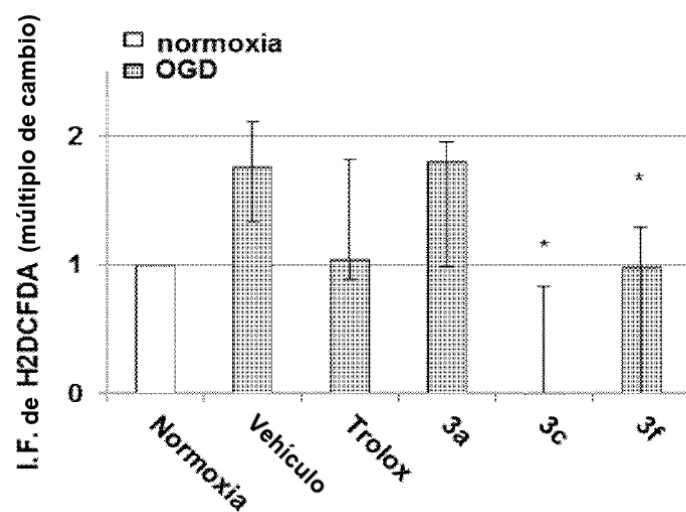


FIG. 4

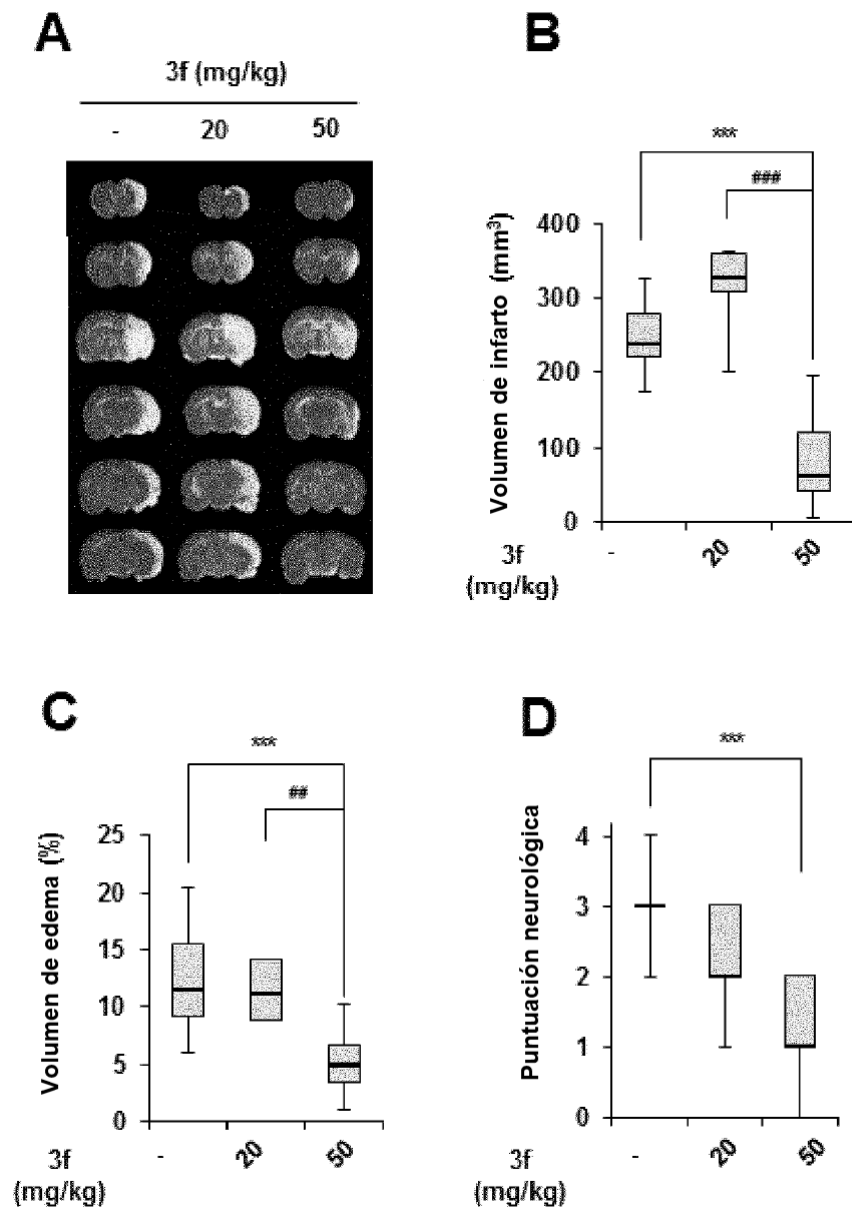


FIG. 5

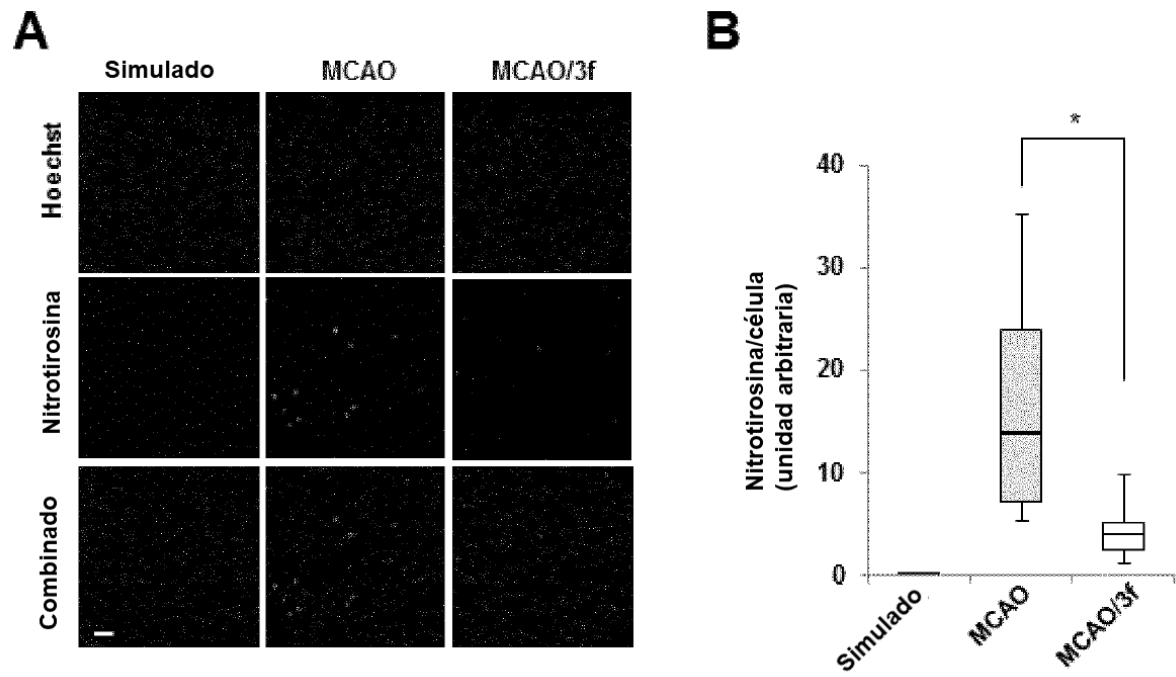


FIG. 6

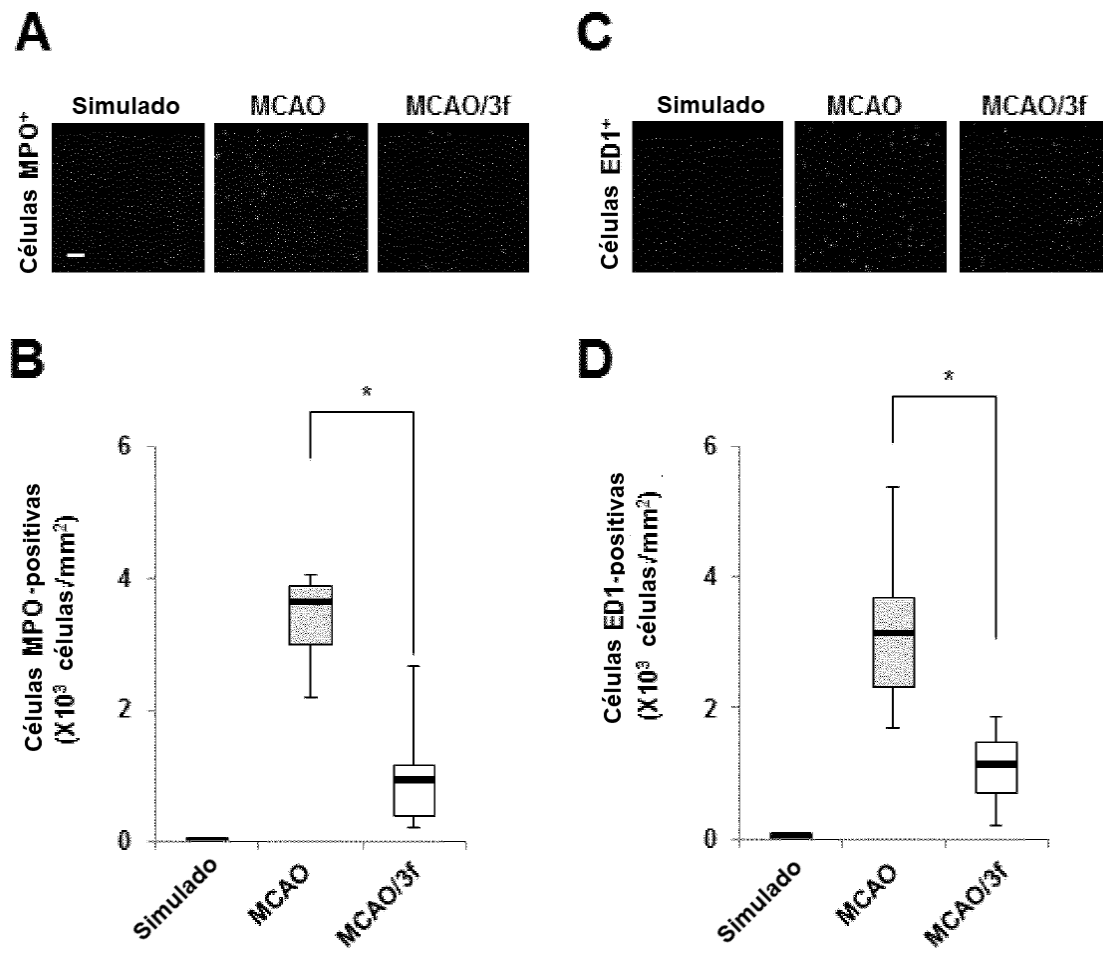


FIG. 7

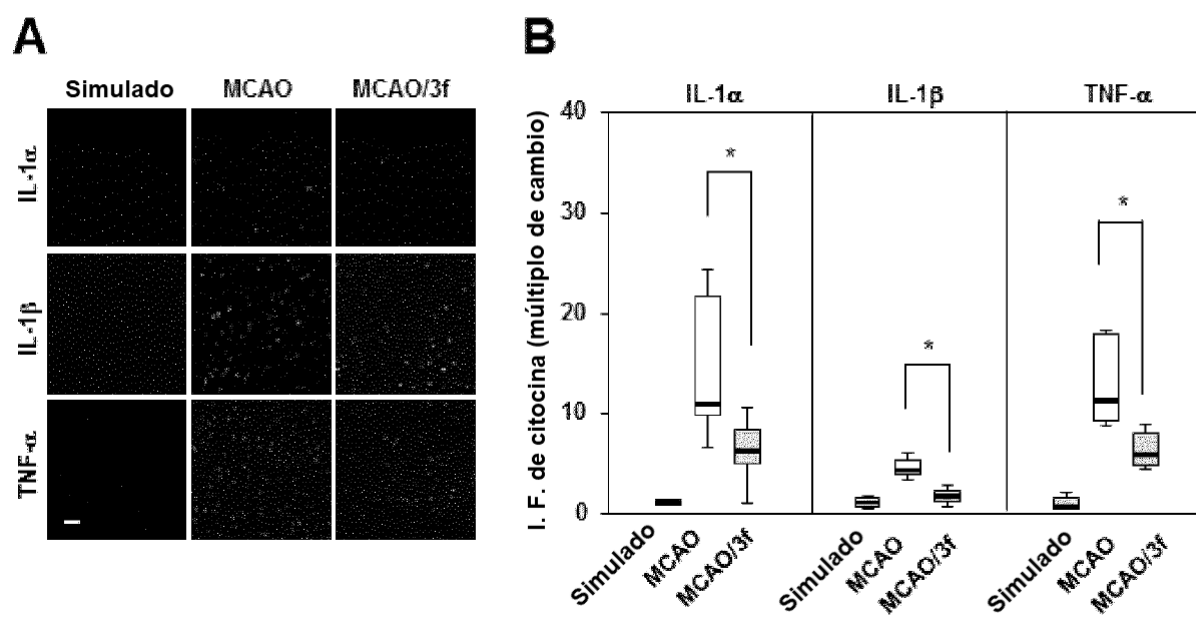


FIG. 8

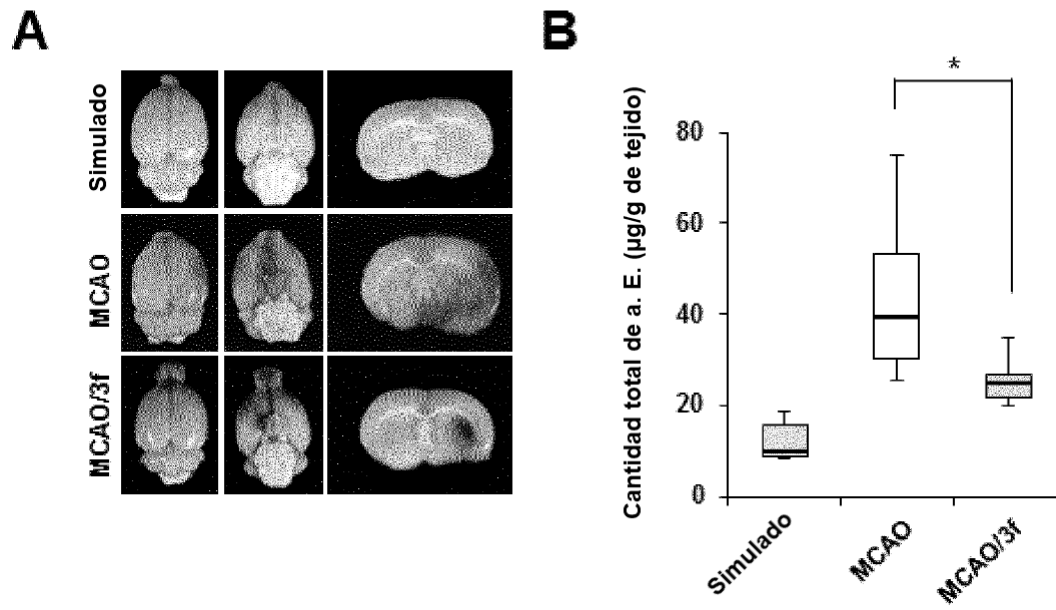


FIG. 9

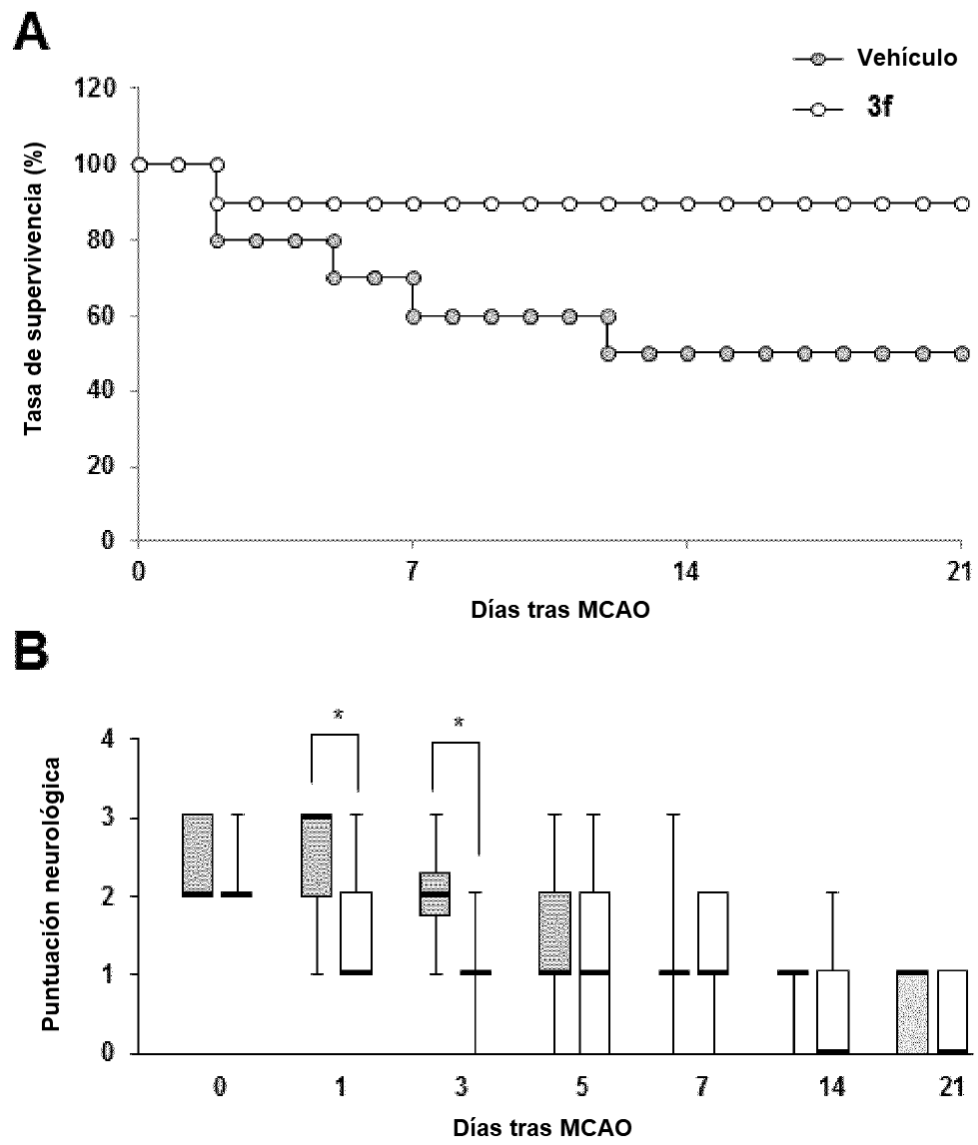


FIG. 10

